

Die Insulinwirkung im Serum von Houssay-Hunden

Rüdiger Petzoldt

1964

Aus der Endokrinologischen Abteilung (Leiter: Prof.Dr. E.F. Pfeiffer)
der I. Medizinischen Universitätsklinik (Direktor: Prof. Dr. F. Hoff)
Frankfurt am Main

=====

Die Insulinwirkung im Serum von Houssay-Hunden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Rüdiger Petzoldt
aus Wuppertal

Frankfurt am Main 1964



Dekan: Prof. Dr. med. H. Frick

Referent: Prof. Dr. med. K. Schöffling

Korreferent: Prof. Dr. med. J. Frey

Mündliche Prüfung: 26. 3. 1965

Herrn Professor Dr. K. S c h ö f f l i n g von der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt/Main danke ich für die Überlassung des Themas und für die wertvolle Hilfe, mit der er mich bei der Ausführung der Arbeit unterstützte.

Frau Professor Dr. Dr. A. S i r e k vom Banting and Best Department for Medical Research, Universität Toronto, Kanada, die gemeinsam mit Herrn Professor Dr. K. Schöffling die Operationen durchführte, gilt mein besonderer Dank.

Herrn Professor Dr. E. F. P f e i f f e r , Leiter der Endokrinologischen Abteilung der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt/Main, bin ich für Anregungen und für die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen zu Dank verpflichtet.

Herrn Privatdozent Dr. H. D i t s c h u n e i t von der gleichen Klinik danke ich für die grosszügige Hilfe bei der Einarbeitung in die verschiedenen Methoden.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <u>Einleitung und Fragestellung</u>	1
II. <u>Zusammenstellung der tierexperimentellen Untersuchungen über die endokrine Regulation des Kohlenhydrat - Stoffwechsels unter besonderer Berücksichtigung der Veränderungen des Insulinblutspiegels</u>	4
III. <u>Zusammenstellung der Untersuchungen über die Insulinwirkung im Blut von Mensch und Tier</u>	8
IV. <u>Versuchsanordnung</u>	13
V. <u>Methodik</u>	15
A. Operationsmethoden	15
1. Hypophysektomie	15
2. Pankreatektomie	15
B. Glucosebestimmungen	16
1. Glucosebestimmung nach King	16
2. Glucosebestimmung nach Huggett und Nixon	18
C. Bestimmung der Insulinwirkung von Serum und Serum-eiweissfraktionen	21
1. Bestimmung der Insulinwirkung mit dem isolierten epididymalen Rattenfettgewebe	21
2. Bestimmung der Insulinwirkung mit dem isolierten Rattendiaphragma	26
3. Bestimmung der Insulinwirkung mit Insulin-bindenden Antikörpern	29
a. Inkubation von Serum, Insulinantikörper und Jod-131-markiertem Insulin	30
b. Trennung in freies und Antikörper-gebundenes Insulin	32
D. Zonenelektrophoretische Darstellung von Serum-eiweissfraktionen	35

E. Papierelektrophoretische Darstellung von Serum-eiweissfraktionen	36
F. Präparation von Anti-Insulin-Serum	37
G. Statistische Auswertung	38

. VI. Ergebnisse 40

A. Versuchsverlauf	40
B. Blutzuckerwerte vor und nach Pankreatektomie bzw. vor und nach Hypophysektomie und Pankreatektomie (Versuchsgruppe K und L)	41
C. Serum-Insulinwirkung vor und nach alleiniger Pankreatektomie (Fettgewebsmethode; Versuchsgruppe K)	41
D. Serum-Insulinwirkung vor und nach Hypophysektomie und Pankreatektomie (Versuchsgruppe L)	41
1. Mit der Fettgewebsmethode gemessene Serum-Insulinwirkung	41
2. Mit der Diaphragmamethode gemessene Glucoseaufnahme	44
3. Mit der immunologischen Methode gemessene Serum-Insulinwirkung	46
E. Insulinwirkung in zonenelektrophoretisch dargestellten Serumeiweissfraktionen vor und nach Hypophysektomie und Pankreatektomie (Versuchsgruppe L)	47
1. Mit der Fettgewebsmethode gemessene Insulinwirkung	47
a. Absolute Werte	47
b. Prozentuale Verteilung	48
2. Mit der Diaphragmamethode gemessene Netto-Glucoseaufnahme	48
a. Absolute Werte	48
b. Prozentuale Verteilung	50

VII. <u>Diskussion</u>	51
VIII. <u>Schlussbetrachtung</u>	59
IX. <u>Zusammenfassung</u>	65
X. <u>Tabellen 1 - 15</u>	68
XI. <u>Literaturverzeichnis</u>	85
XII. <u>Lebenslauf</u>	94

I. Einleitung und Fragestellung

In der Blutzuckerregulation des Organismus nimmt das Inselorgan der Bauchspeicheldrüse eine entscheidende Stellung ein. Das in den beta-Zellen der Pankreasinseln gebildete Hormon, das Insulin, ist der einzige Wirkstoff, der den Zuckergehalt des Blutes senken kann. Er greift in der Peripherie des Organismus an und fördert bzw. reguliert den Einstrom der Glukose in die Gewebe.

Mehrere andere endokrine Drüsen produzieren dagegen Hormone mit blutzuckersteigernder Wirkung. Das Wachstumshormon der Hypophyse (STH) hemmt die Glukoseoxydation; das ebenfalls im Hypophysenvorderlappen gebildete adrenocorticotrope Hormon (ACTH) stimuliert die Bildung von Nebennierenrindenhormonen (Glucocorticoide), die die Gluconeogenese aus Proteinen fördern. Adrenalin aus dem Nebennierenmark und Glucagon, das in den alpha-Zellen der Pankreasinseln gebildet wird, wirken durch die Mobilisierung des Glykogens aus den Leber- und Muskeldepots.

Durch diese verschiedenen Regulationsmechanismen wird die Glukosekonzentration im Blut konstant gehalten. Physiologische Schwankungen (z.B. im Anschluss an die Nahrungsaufnahme) werden in kurzer Zeit ausgeglichen.

Die wichtigste Störung des Gleichgewichtes zwischen dem blutzuckersenkenden Insulin auf der einen und den blutzuckersteigernden Faktoren auf der anderen Seite stellt der Diabetes mellitus dar, der auf einen effektiven Insulinmangel zurückzuführen ist. Das Grundsymptom dieser Kohlenhydrat-Stoffwechsel-

krankheit ist der erhöhte Blutzuckerspiegel (Hyperglykämie), der eine Harnzuckerausscheidung (Glukosurie) zur Folge hat.

Dieselben Erscheinungen finden sich auch bei einem experimentell durch Entfernung des Pankreas erzeugten Diabetes, wie von Mering und Minkowski (1889-90) erstmals feststellen konnten. In grossem Umfang wurden die Ausfallerscheinungen nach Pankreatektomie jedoch erst viele Jahre später von Houssay und seiner Arbeitsgruppe (1930 a,b; 1931 a,b; 1932) aufgeklärt. Sie fanden dabei, dass der Diabetes bei pankreaslosen Tieren durch die Entfernung der Hypophyse gebessert werden kann. Diese pankreaslosen hypophysektomierten Tiere (Houssay-Tiere) überlebten die Pankreatektomie wesentlich länger als Tiere, denen nur die Bauchspeicheldrüse entfernt worden war.

Während Houssay und seine Mitarbeiter den Einfluss der Pankreatektomie auf den Kohlenhydrat-Stoffwechsel nur mit Hilfe der Bestimmung von Kohlenhydratabbau- und -ausscheidungsprodukten untersuchen konnten, stehen in neuerer Zeit auch Methoden zur Bestimmung der Insulinwirkung im Blut zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit soll über den Einfluss der Pankreatektomie auf die Serum-Insulinwirkung bei Hunden berichtet werden. Die angestrebte lange Versuchsdauer war jedoch nur durch zusätzliche Hypophysektomie möglich, die daher bei unseren Versuchstieren durchgeführt wurde. Neben dem Einfluss der Pankreatektomie auf die Gesamt-Serum-Insulinwirkung wurde auch die Bedeutung des Eingriffs auf die Insulinwirkung in den Serumeiweissfraktionen untersucht.

In Anbetracht der zahlreichen Diskrepanzen im Schrifttum wurden in den vorliegenden Untersuchungen am gleichen Material die folgenden drei Methoden zur Insulinbestimmung angewandt: die Bestimmung mit dem isolierten epididymalen Rattenfettgewebe, dem isolierten Rattendiaphragma und die Bestimmung mit Hilfe Insulin-bindender Antikörper.

Die Ergebnisse der Untersuchungen - das sei schon hier kurz angedeutet - lassen erkennen, dass bei Hunden auch

längere Zeit nach der Pankreatektomie die mit dem Rattenfettgewebe und dem Rattendiaphragma gemessene Insulinwirkung nicht vollständig aus dem Serum verschwindet. Die Verteilung der Insulinwirkung in den Serumeiweissfraktionen verschiebt sich nach der Pankreatektomie zugunsten der "gebundenen" Form des Insulins.

II. Zusammenstellung der tierexperimentellen Untersuchungen über die endokrine Regulation des Kohlenhydrat-Stoffwechsels unter besonderer Berücksichtigung der Veränderungen des Insulinblutspiegels

Schon aus den ersten Beobachtungen am pankreatektomierten Tier (von Mering und Minkowski, 1889-90) ging hervor, dass das antidiabetische Prinzip im Pankreas lokalisiert ist. Der Beweis wurde 1922 von Banting und Best mit der Isolierung des Insulins aus der Bauchspeicheldrüse erbracht. Zahlreiche Untersuchungen über die endokrine Regulation des Kohlenhydrat-Stoffwechsels schlossen sich in der Folgezeit an. Durch die Entfernung innersekretorischer Drüsen oder durch die Injektion eines Extraktes oder Hormones aus diesen Drüsen konnte ihr Einfluss auf den Kohlenhydrat-Stoffwechsel des Organismus geklärt werden. Die wichtigsten Versuche zu dieser Frage zeigt die von Conn (1953) zusammengestellte und von Pfeiffer (1957) vereinfachte schematische Darstellung in Abb. 1.

Ebenso wie schon von Mering und Minkowski (1889-90) stellten auch Houssay und Biasotti (1930 a,b; 1931 b) bei Hunden und Kröten nach Pankreatektomie das Auftreten eines sog. Pankreasdiabetes fest. Entfernten sie danach bei den pankreatektomierten Tieren auch noch die Hypophyse (sog. Houssay-Tiere), dann besserten sich die Symptome des Diabetes wesentlich. Die Exstirpation der Schilddrüse hatte dagegen keinen Einfluss auf die diabetische Stoffwechselstörung (Houssay und Biasotti, 1931 b). Nach subkutaner Applikation von Drüsenlappen-Extrakten (der Drüsenlappen der untersuchten Krötenart - *bufo arenarum* - entspricht dem Hypophysenvorderlappen bei Säugern) traten bei den vorher pankreatektomierten und hypophysektomierten Tieren wieder - wie nach alleiniger Pankreatektomie - die Symptome des Pankreasdiabetes auf (Houssay und Biasotti, 1931 a). Dasselbe Ergebnis hatte die Behandlung von Houssay-Hunden mit einem Alkoholextrakt aus dem Hypophysenvorderlappen von Rindern (Houssay u.M., 1932). Aufgrund dieser Resultate

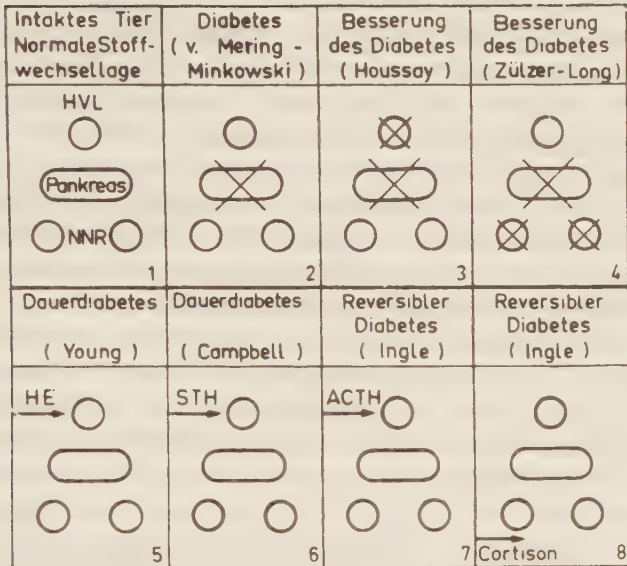


Abb. 1 Schematische Darstellung der Versuche zur Klärung der kontrainsulären Wirkung von HVL und NNR (aus: Pfeiffer, 1957; modifiziert nach Conn, 1953)

X = Exstirpation eines endokrinen Organs
 → = Injektion eines Drüsenextraktes oder Hormones
 HE = Hypophysenextrakte
 HVL = Hypophysenvorderlappen
 NNR = Nebennierenrinde
 STH = Wachstumshormon
 ACTH = adrenocorticotropes Hormon

schlossen Houssay und Biasotti (1930 a,b; 1931 a,b; 1932) daher auf einen funktionellen Antagonismus zwischen dem antidiabetisch wirkenden Pankreas und dem diabetisch wirkenden Hypophysenvorderlappen.

Seit diesen ersten Untersuchungen von Houssay und seiner Arbeitsgruppe haben zahlreiche Forscher den Einfluss von Pankreas, Hypophyse und anderen endokrinen Organen auf die Stoffwechsellage des Organismus untersucht. So konnten Long und Lukens (1936) in Fortführung der Versuche von Zuelzer u.M. (1908) die diabetische Stoffwechselstörung von pankreaslosen Katzen durch die Entfernung der Nebenniere erheblich bessern. Young (1937, 1938) und später Campbell u.M. (1950) sowie Campbell (1955) zeigten, dass nach längerer Gabe von Hypophysenextrakten und gut gereinigten STH-Präparationen bei pankreasintakten Katzen und Hunden - jedoch nicht bei Ratten - ein Diabetes auftritt. Ingle (1941) erzeugte erstmals bei normalen Ratten durch Injektion von ACTH einen Reversiblen Diabetes, Ingle u.M. (1946) fanden das gleiche Ergebnis nach Injektion von Cortison.

Während der letzten 10 Jahre wurde nun der Einfluss der verschiedenen, den Kohlenhydrat-Stoffwechsel beeinflussenden Hormone mit Hilfe der inzwischen entwickelten Methoden zur Blut-Insulinbestimmung (Groen u.M., 1952; Martin u.M., 1958; Yalow und Berson, 1960 a) untersucht.

Dabei fanden Groen u.M. (1952), Okumura (1960), Vallance-Owen und Lukens (1957) sowie Takeuchi (1957) nach Pankrektomie bzw. Alloxanbehandlung im Blut von Hunden und Katzen und Bornstein und Park (1953) im Blut von alloxandiabetischen Ratten mit Hilfe der Bestimmung am isolierten Rattendaphragma keine Insulinwirkung. Wurde alloxandiabetischen Ratten auch die Hypophyse oder die Nebennierenrinde entfernt, dann zeigte sich wieder die gleiche Insulinwirkung wie bei normalen Tieren (Bornstein und Park, 1953; Whitney und Young, 1957); bei alloxandiabetischen hypophysektomierten Ratten fehlte sie nach intravenöser STH- und Cortison-Behandlung jedoch ganz. Randle und Young (1956) konnten nach alleiniger

Hypophysektomie bei Ratten sowie nach längerer STH-Behandlung bei normalen Katzen keine Insulinwirkung nachweisen. Ebenso fehlte schliesslich auch im Blut von Hypophysektomierten und pankreatektomierten Katzen mit diesem Verfahren jede Insulinwirkung (Vallance-Owen und Lukens, 1957).

Dagegen fanden zahlreiche Arbeitsgruppen mit Hilfe der Bestimmung am isolierten epididymalen Rattenfettgewebe auch mehrere Tage nach Pankreatektomie im Blut von Katzen (Steinke u.M., 1962) und Hunden (Leonards, 1959; Goldberg und Egdahl, 1961; Slater u.M., 1961; Steinke u.M., 1962; Leonards u.M., 1962; Egdahl und Goldberg, 1962; Samaan u.M., 1963) nur geringfügig verringerte, im Höchstfall (Steinke u.M., 1962) auf 50% des Normalwertes abgefallene Insulinwirkungen. Auch bei den Untersuchungen von Saure (1963), die in anderem Zusammenhang in unseren Laboratorien durchgeführt wurden, fand sich nur ein Abfall der Insulinwirkung auf die Hälfte des Ausgangswertes. Lediglich Samaan u.M. (1963) konnten bei einem pankreatektomierten Hund und bei einem pankreaslosen, alloxanbehandelten Hund mit dieser Technik keine Insulinwirkung nachweisen. Ball und Knobil (1963) beobachteten nach alleiniger Hypophysektomie bei Affen einen Abfall der Insulinwirkung auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes. Bei hypophysektomierten und pankreatektomierten Katzen konnten Steinke u.M. (1962) drei Tage nach den Operationen ebenfalls nur einen Abfall aber kein Verschwinden der Serum-Insulinwirkung feststellen.

Mit der immunologischen Methode konnte Berson (1962) in ausgewählten Seren einiger von Goldberg und Egdahl (1961) pankreatektomierter Hunde keine Insulinwirkung nachweisen. Dieselben Seren zeigten mit Hilfe der Bestimmung am isolierten epididymalen Rattenfettgewebe keinen Abfall der Insulinwirkung.

III. Zusammenstellung der Untersuchungen über die Insulinwirkung im Blut von Mensch und Tier

Für die Bestimmung von kleinen Insulinmengen im Blut stehen bis heute lediglich biologische Methoden zur Verfügung. Neben den schwierigen in vivo-Verfahren, mit denen der Effekt von Insulin auf den Blutzuckerspiegel speziell vorbereiteter Ratten oder Mäuse gemessen wird, werden seit 10 Jahren mehrere in vitro-Methoden zur Erfassung des Verhaltens des Blutinsulinspiegels unter physiologischen und pathologischen Bedingungen angewandt.

Bei diesen Methoden handelt es sich jedoch um biologische Verfahren, mit denen nicht der absolute Insulingehalt, sondern nur die effektive Insulinwirkung von Serum oder Plasma auf den Kohlenhydratstoffwechsel eines isolierten Gewebes gemessen und mit dem Effekt einer bekannten Menge kristallinen Insulins verglichen wird. Da auch andere Faktoren den Stoffwechsel des isolierten Gewebes im gleichen Sinne wie Insulin beeinflussen können, wird der in vitro gemessene Serum- oder Plasmaeffekt allgemein als "insulinähnliche Wirkung", im anglo-amerikanischen Schrifttum als "insulin-like activity" bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wird die Bezeichnung "Serum-Insulinwirkung" benutzt.

Bei den einzelnen Verfahren wird die Stoffwechselwirkung des Insulins an verschiedenen Geweben und mit Hilfe unterschiedlicher Stoffwechselgrößen gemessen. Daher sind die Ergebnisse, die mit den einzelnen Methoden gewonnen werden, oft different und nur schwer miteinander zu vergleichen.

Zur Messung dieses Insulineffektes auf den Kohlenhydratstoffwechsel eines isolierten Gewebes stehen folgende Parameter zur Verfügung: die Glukoseaufnahme des Gewebes, der Glykogenabbau, die Oxydation von Glukose zu Kohlendioxyd. Am besten bewährt haben sich bisher die Glukoseaufnahme durch das isolierte Rattendiaphragma und die Glukoseoxydation (zu CO_2) durch das isolierte epididymale Rattenfettgewebe.

Die Bestimmung der Insulinwirkung mit dem isolierten Rattenhemidiaphragma (Groen u.M., 1952; Vallance-Owen und Hurlock, 1954; Randle, 1954) benutzt als Mass für die vorhandene Insulinmenge die Glukoseaufnahme des Gewebes. Dabei unterliegen die Dosis-Wirkungsbeziehungen der Methode exponentiellen Gesetzmässigkeiten. Die Korrelation des Logarithmus der Insulinkonzentration mit der 3. Wurzel aus der gemessenen und auf Diaphragmagewicht umgerechneten Glukoseaufnahme ergibt eine annähernd lineare Regression (Groen u.M., 1952; Vallance-Owen und Hurlock, 1954; Randle, 1954; Willebrands u.M., 1958). Als Genauigkeitsindex (λ) wurde von Randle (1954) ein verhältnismässig hoher Wert von 0.36 gefunden. Die Methode ist damit nicht besonders genau, in der Reaktion auf niedrige Konzentrationen von kristallinem Insulin (bis $10 \mu\text{E/ml}$) jedoch ausreichend empfindlich.

Von den zahlreichen Stoffwechselgrössen, die bei den Untersuchungen mit Hilfe des isolierten epididymalen Rattenfettgewebes als Parameter zur Verfügung stehen, wird besonders häufig die Oxydation von Glukose zu Kohlendioxyd benutzt (Martin u.M., 1958). Dabei handelt es sich nach den Untersuchungen von Milstein (1956) wahrscheinlich um eine selektive Wirkung von Insulin auf die direkte Oxydation von Glukose über den Dickens-Horecker-Zyklus. Gemessen wird die Bildung von C^{14}O_2 aus der in einer kleinen Menge der Probe zugegebenen, am 1. Kohlenstoffatom radioaktiv markierten Glukose (Ditschuneit u.M., 1962). Auch bei diesem Insulinbestimmungsverfahren unterliegen die Dosiswirkungsbeziehungen exponentiellen Gesetzmässigkeiten. Eine lineare Regression besteht bei Korrelation des Logarithmus der Insulinkonzentration mit der Quadratwurzel aus den gemessenen und auf das Fettgewicht umgerechneten radioaktiven Impulsen. Im Vergleich mit der Bestimmung am Rattendaphragma ist diese Methode mit einem Genauigkeitsindex (λ) von 0.15 ± 0.08 (Ditschuneit u.M., 1962) wesentlich genauer und mit einer unteren Messgrenze von $10 \mu\text{E/ml}$ ebenso empfindlich.

Ausser diesen auf den Stoffwechselwirkungen des Insulins beruhenden biologischen Verfahren stehen seit 1956 auch noch immunologische Methoden zur Verfügung, die die neutralisierenden (Arquilla und Stavitski, 1956; Wardlaw und Moloney, 1961) und bindenden Eigenschaften von Insulinantikörpern (Grodsky und Forsham, 1960; Yalow und Berson, 1960 a) zur Bestimmung von Insulin benutzen. Die damit gemessenen Werte entsprechen wahrscheinlich eher dem absoluten Insulingehalt der unbekannten Proben, da andere stoffwechselwirksame Faktoren die Antikörperreaktionen nicht beeinflussen. Bei der von Yalow und Berson (1960 a) angegebenen Methode binden die vom Meerschweinchen gewonnenen Insulin-Antikörper sowohl einen Teil des unbekannten Insulins einer Probe als auch einen Teil des in kleinen Mengen zugesetzten Jod-131-markierten Insulins. Als Mass für die Insulinwirkung der unbekannten Probe gilt das Verhältnis von an Antikörper gebundenem zu freiem Jod-131-markiertem Insulin. Bei konstanten Konzentrationen von Jod-131-markiertem Insulin und Insulin-Antikörpern wird dies Verhältnis durch steigende und fallende Mengen nicht markierten Insulins umgekehrt proportional beeinflusst, da das nicht markierte Insulin die Bindung von Jod-131-markiertem Insulin an die Antikörper kompetitiv hemmt.

Das Problem dieser Methode liegt in der Trennung von Antikörper-gebundenem und freiem Jod-131-markiertem und unmarkiertem Insulin. Yalow und Berson (1960 a) benutzen dazu die Papierelektrophorese mit anschliessender Radiochromatographie. Das ist aber nur bei sehr hoher radioaktiver Markierung des Insulins (100 - 150 mC/mg) möglich, wobei wahrscheinlich ein Teil der Insulinmoleküle zerstört wird. Diese Gefahr wird jedoch bei der Trennung mit Hilfe eines Harzionenaustauschers (Meade und Klitgaard, 1962) oder mit der Elektrophorese im Agarosegel (Melani u.M., 1963 a) umgangen, weil dabei nur eine kleine spezifische Aktivität des Jod-131-markierten Insulins (6 - 20 mC/mg) benötigt wird.

In beiden Fällen ist die Trennung einfach. Der Harzionen-austauscher (Dowex) bindet das freie Insulin, das durch Zentrifugieren von dem im Überstand verbleibenden gebundenen Insulin getrennt werden kann. Bei der Elektrophorese im Agargel wandert das freie Insulin mit den Albuminen und alpha-Globulinen, das gebundene Insulin mit den beta- und gamma-Globulinen.

Da zwischen der Insulinkonzentration und dem Verhältnis von Antikörper-gebundenem zu freiem Jod-131-markiertem Insulin eine hyperbolische Gesetzmässigkeit besteht, verteilen sich bei graphischer Darstellung mit doppelt logarithmischer Koordinatenteilung die Messwerte auf einer Geraden. Als Genauigkeitsindex (λ) wurde ein Wert von 0.24 errechnet (Melani u.M., 1963 a), die Empfindlichkeit mit einer unteren Messgrenze von 1 μ E/ml (Yalow und Berson, 1960 a) ist gross.

Der Charakter der insulinären und kontrainsulinären Faktoren, die die verschiedenen Insulinbestimmungsmethoden beeinflussen, ist weitgehend noch ungeklärt. Ausser Hormonen und durch intravenöse Insulinbehandlung bedingten Antikörpern sind mehrere Insulinantagonisten bekannt (Bornstein, 1953; Bornstein und Park, 1953; Randle und Young, 1956; Whitney und Young, 1957; Vallance-Owen, 1960 a; Vallance-Owen u.M., 1957; 1958 a,b; 1961 a,b; Lowy u.M., 1961; Lyngsoe, 1962). Diese Antagonisten können jedoch nur bei Versuchstieren mit intakter Hypophyse und Nebennierenrinde und nur mit Hilfe des isolierten Rattendiaaphragma nachgewiesen werden.

Weiterhin wird unter den Einflüssen, die die Insulinbestimmung verfälschen können, die physiologische Bindung von Insulin an Serumproteine diskutiert. Antoniades u.M. haben in zahlreichen Versuchen zeigen können (Antoniades, 1961, 1962; Antoniades u.M., 1958; 1961 a,b; 1962 a,b), dass bei der Behandlung einer Serumprobe mit einem Kationenaustauscher ein Teil der vorhandenen, mit Hilfe des isolierten epididymalen

Rattenfettgewebes messbaren Insulinwirkung an das Harz adsorbiert wird. Für das adsorbierte sog. "gebundene" Insulin wird eine in vivo inaktive, an ein basisches Protein komplex gebundene Form angenommen. Es kann normalerweise nur mit Hilfe des Rattenfettgewebes, nach Behandlung mit einem Fettgewebsextrakt jedoch auch mit der Zwerchfellmethode gemessen werden. Das ungehindert durch den Ionenaustauscher durchlaufende sog. "freie" Insulin ist sowohl mit der Diaphragma- als auch mit der Fettgewebsmethode nachweisbar.

Die Ergebnisse von Antoniades und seiner Arbeitsgruppe wurden im Prinzip von Ditschuneit u.M. (1962) bestätigt, die nach zonenelektrophoretischer Trennung der Serumproben in ihre Eiweißfraktionen die in den gamma- und beta-Globulinen nachgewiesene Serum-Insulinwirkung mit dem "gebundenen" und die in den alpha-Globulinen und Albuminen bestimmte Serum-Insulinwirkung mit dem "freien" Insulin vergleichen.

Die zahlreichen Faktoren, die die heute möglichen in vitro-Methoden zur Insulinbestimmung im Blut beeinflussen können, lassen also eine Messung von absoluten Insulinmengen nicht zu. Daher müssen die im Serum oder Plasma erfassten "Insulinwirkungen" lediglich als Annäherungswerte verstanden werden (Pfeiffer u.M., 1961).

IV. Versuchsanordnung

Die Versuche wurden an insgesamt 15 Mischlingshunden mit einem Körpergewicht zwischen 8 und 18 kg durchgeführt, die in 2 Versuchsgruppen eingeteilt wurden.

Die 3 Tiere der ersten Versuchsgruppe wurden nur pankreat-
ektomiert. Sie starben trotz Insulinbehandlung vor oder kurz nach der darauffolgenden Hypophysektomie.

Aus der zweiten Versuchsgruppe von 12 Versuchshunden wurden 11 Tiere zunächst hypophysektomiert und 2 Wochen später pankreatektomiert; bei einem Hund wurde die zweite Operation im unmittelbaren Anschluss an die erste vorgenommen.

Nach der ersten Operation wurden die Tiere 5 Tage lang mit Procain-Penicillin behandelt (200 000 E/Tag intramuskulär). Ausserdem erhielten die hypophysektomierten Hunde 24 Stunden vor der Pankreatektomie 25 mg Cortison und 5 mg Desoxycorticosteronacetat intramuskulär und die Hälfte dieser Dosis während 7 Tagen nach der 2. Operation. Mit Insulin wurden nur die 3 Tiere der ersten Versuchsgruppe behandelt; die 12 Hunde der zweiten Versuchsgruppe erhielten während der gesamten Versuchsdauer kein Fremdinsulin.

Vom ersten postoperativen Tag an wurden die Hunde mit wäichem Griessbrei und rohem Kälberpankreas gefüttert. Später bestand das Futter neben dem Pankreas aus üblichem Hundefutter unter Zusatz von Fleisch und Wurst.

Blutproben wurden vor, zwischen und nach den Operationen in etwa wöchentliohen Abständen aus einer Beinvene entnommen. Das im Nüchternzustand gewonnene Blut wurde mit Heparin versetzt. Nach der Bestimmung des Blutzuckers wurde das Serum abzentrifugiert und für die weiteren Untersuchungen bei -20°C eingefroren.

Die Überlebenszeit der 12 Houssay-Hunde lag zwischen 1 und 5 Wochen. 6 der Tiere wurden getötet und vollständig entblutet, um genügende Mengen von Serum für ausgedehntere Untersuchungen zu gewinnen.

In allen 12 Fällen wurde nach dem Tod eine Autopsie durchgeführt und die Vollständigkeit der Operationen gesichert.

V. Methodik

V.A. Operationsmethoden

Die Operationen wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Zur Narkose wurde Nembutal (25 mg/kg Körpergewicht) intravenös injiziert.

1. Hypophysektomie

Die Hypophyse wurde auf dem von Essex und Astarabadi (1953) und Markowitz und Archibald (1956) beschriebenen transbuccalen Weg entfernt, um eine Verletzung des Gehirns zu vermeiden.

Dabei wird zunächst die Gegend der sella turcica am Dach des Nasopharynx freigelegt und das knöcherne Bett der Hypophyse im os sphenoidale vorsichtig mit einem Zahnbohrer entfernt. Die nun freiliegende dura mater wird mit einem kleinen gebogenen Skalpell in Längsrichtung eingeschnitten, wobei der die Hypophyse umgebende sinus semicircularis nicht verletzt werden darf. Unter Augenkontrolle wird die Hypophyse mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und anschließend histologisch untersucht.

2. Pankreatektomie

Die Entfernung des Pankreas wurde nach der von Sirek (1963, persönliche Mitteilung) modifizierten Standardmethode vorgenommen.

Nach Eröffnung des Abdomen durch einen vom processus xiphoideus zum Nabel verlaufenden Mittelschnitt werden zunächst die zum processus uncinatus des Pankreas ziehenden Gefäße unterbunden, während die das Duodenum versorgenden Gefäße unberührt bleiben. Sodann wird der

Körper des Pankreas unter sorgfältiger Schonung des Darmes und der Gefäße vom Duodenum und den Pancreatico-duodenal-Gefäßen gelöst. Lediglich kleine, nur zum Pankreas ziehende Gefäße werden doppelt unterbunden und zwischen den Ligaturen getrennt. Besonders sorgfältig wird das fest am Duodenum haftende Pankreasgewebe im Bereich des großen und kleinen Pankreasganges vom Darm und den anliegenden Milzgefäßen freipräpariert, bevor die beiden Pankreasgänge doppelt unterbunden und getrennt werden. Auch der Schwanz des Pankreas im Bereich des Pylorus wird so vom Darm gelöst, daß alle größeren, den Darm ernährenden Gefäße verschont bleiben und nur die kleinen Pankreasgefäße unterbunden werden. Zum Abschluß wird das Operationsgebiet und ein möglichst großer Teil des Dünndarms nach Pankreasresten und -ektopen abgesucht. Während der Operation wird durch atraumatische Unterbindung auch der kleinsten Gefäße (Sirek, 1957) der Blutverlust möglichst gering gehalten. Die größeren Pankreas- und Duodenalgefäße müssen aber immer sorgfältig geschont werden, um eine Ischämie und Nekrose der Duodenalschlinge zu vermeiden.

In allen Fällen konnte nach dem Tod der Tiere die Vollständigkeit beider Operationen gesichert werden. Das Operationsgebiet war frei von Pankreasresten; längs des Dünndarms konnten keine der seltenen Pankreasektopen (Barron, 1959) gefunden werden. Die sella turcica war leer.

V.B. Glucosebestimmungen

1. Glucosebestimmung nach King

Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden die Blutzuckerwerte aller Proben mit der Mikromethode von King (1951) bestimmt.

Hierbei werden die Proteine der Proben präzipitiert und der Überstand mit einem Kupferreagens behandelt. Das dabei entstehende Kupferoxyd bildet nach Zugabe von Phosphomolybdänsäure den Farbstoff Molybdänblau, dessen Stärke gemessen wird und als Maß für die vorhandene Glucosemenge gilt.

Erforderliche Reagentien

- (1) Kupfersulfat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, p.a.
- (2) Natriumsulfat, $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, p.a.
- (3) Natriumwolframat, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, p.a.
- (4) Natriumcarbonat, Na_2CO_3 , p.a.
- (5) Natriumbicarbonat, NaHCO_3 , p.a.
- (6) Kaliumoxalat, KHC_2O_4 , p.a.
- (7) Natriumkaliumtartrat, $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, p.a.
- (8) Natriumhydroxyd, NaOH , p.a.
- (9) Phosphorsäure, H_3PO_4 , p.a., 89%
- (10) Molybdänsäure, H_2MoO_4 , p.a.
- (11) Standardglucoselösung (Lab-Trol, Dade Reagents, Inc., Miami, Fla., USA), 103 mg%

Herstellung der Lösungen

- (I) Isotonische Natriumsulfat-Kupfersulfat-Lösung:
320 ml $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (3%) + 30 ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (7%)
- (II) Natrium-Wolfram-Säure:
10 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ mit Aqua bidest. auf 100,0 ml auffüllen.
- (III) Kupfer-Reagens:
Täglich neu aus gleichen Mengen der Lösungen A und B zubereiten.
Lösung A: 13 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ mit Aqua bidest. auf 100,0 ml auffüllen.
Lösung B: 50 g NaHCO_3 in einem Schüttelbecher mit Aqua bidest. auf ca. 700,0 ml auffüllen.
40 g Na_2CO_3 dazugeben, gut lösen.
36,8 g KHC_2O_4 in ca. 120,0 ml Aqua bidest. (angewärmt) lösen, dazugeben.

24 g $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ in ca. 100,0 ml Aqua bidest lösen, dazugeben.

Mischung gut schütteln.

Mit Aqua bidest. auf 1000,0 ml auffüllen.

(IV) Phosphomolybdänsäure-Reagens:

35 g H_2MoO_4 und 5 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ mit 2n NaOH auf 250,0 ml auffüllen, gut lösen, 30 min kochen; mit Aqua bidest. auf 350,0 ml auffüllen.

125,0 ml H_3PO_4 (89%) dazugeben, mischen.

Mischung mit Aqua bidest. auf 500,0 ml auffüllen.

Arbeitsweise

In ein konisches Zentrifugenglas werden 0,1 ml Blut, 1,8 ml isotonische Natriumsulfat-Kupfersulfat-Lösung und nach 10 min 0,1 ml Natrium-Wolfram-Säure pipettiert. Die Mischung wird gut geschüttelt, die präzipitierenden Proteine werden abzentrifugiert (10 min bei 2000 U/min). 1,0 ml des Überstandes - und als Standard 1,0 ml der Standardglucoselösung - werden mit je 1,0 ml Kupfer-Reagens versetzt und in einem verschlossenen Glas 10 min im Wasserbad gekocht. Nach schnellem Abkühlen auf Raumtemperatur werden der Probe und der Standardglucoselösung 3,0 ml Phosphomolybdänsäure-Reagens und 5,0 ml Aqua bidest. zugesetzt.

Die Extinktion der Probe und der Standardglucoselösung wird mit einem Photokolorimeter (Meßstrahlung 515 m μ) gemessen. Der theoretische Wert (Extinktion in 103 mg% Glucoselösung) dividiert durch den gefundenen Wert der Standardglucoselösung ergibt den Faktor, mit dem die Extinktion der unbekannten Probe multipliziert werden muß, um die Glucosekonzentration der Probe in mg% zu errechnen.

2. Glucosebestimmung nach Huggett und Nixon

Mit der von Huggett und Nixon (1957a,b) angegebenen Bestimmungsmethode mit Hilfe von Glucose-Oxydase und Peroxydase wurden die Glucosebestimmungen bei allen Unter-

sungen über die Glucoseaufnahme des isolierten Rattendiaphragma (vgl. Abschn. V.C.2) durchgeführt.

Die bei dem Verfahren verwendete Glucose-Oxydase (GOD) oxydiert spezifisch nur die beta-d-Glucose. Dennoch wird auch die alpha-d-Glucose von der Oxydation erfaßt, da selbst hochgereinigte GOD-Präparate noch geringe Mengen Mutarotase enthalten, die die Umwandlung in die beta-d-Glucose gewährleisten.

Bei der Oxydationsreaktion entsteht delta-Gluconolacton, das durch Hydrolyse unter Bildung von H_2O_2 sofort in die d-Gluconsäure umgewandelt wird.



Aus dem Wasserstoffperoxyd wird durch Zugabe von Peroxydase (POD) Sauerstoff frei, der einen Wasserstoffdonator DH_2 (z.B. o-Dianisidin-hydrochlorid) zu dem Farbstoff D oxydiert.



Die Menge des Farbstoffes kann quantitativ kolorimetrisch mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden. Sie ist ein Maß für die umgesetzte Glucosemenge.

Die Bestimmungen wurden mit den von der Fa. Boehringer-Mannheim hergestellten Reagentien und Fermenten und nach der von der Firma herausgegebenen Arbeitsvorschrift durchgeführt.

Erforderliche Reagentien

- (1) Natriumdihydrogenphosphat, $NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$, p.a.
- (2) Dinatriumhydrogenphosphat, $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$, p.a.
- (3) d-Glucose, DAB 6
- (4) o-Dianisidin-hydrochlorid
- (5) Perchlorsäure, p.a., Dichte 1,67, ca. 70%
- (6) Glucose-Oxydase, (GOD)
- (7) Peroxydase, (POD)

Herstellung der Lösungen

(I) Puffer-Enzym-Gemisch:

2,07 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ + 1,09 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ +
0,006 g POD + 0,038 g GOD mit Aqua bidest. auf
150,0 ml auffüllen.

(II) Chromogen:

10 mg o-Dianisidin-hydrochlorid mit Aqua bidest. auf
2,0 ml auffüllen.

(III) Glucose-Reagens:

50,0 ml Puffer-Enzym-Gemisch + 0,5 ml Chromogen +
3 Tropfen Chloroform.

Fertiges Reagens in einer dunklen Flasche aufbewahren.

(IV) Glucosestandardlösung:

100 mg Glucose + 25,0 ml Perchlorsäure mit Aqua
bidest. auf 1000,0 ml auffüllen.

(V) Perchlorsäure (ca. 0,34 M):

2,9 ml Perchlorsäure (70%) mit Aqua bidest. auf
100,0 ml auffüllen.

Arbeitsweise

Zum Enteiweißen werden 0,1 ml der Probe (Serum, Blut) mit
1,0 ml Perchlorsäure (Lösung V) versetzt. Der Ansatz wird
5 - 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert und vom Überstand
dann 0,2 ml für die Bestimmung verwandt.

In je ein Reagentienglas werden nacheinander pipettiert:

- 1) Reagentien-Leerwert: 5,0 ml Glucose-Reagens
0,2 ml Aqua bidest.
- 2) Glucose-Standardwert: 5,0 ml Glucose-Reagens
0,2 ml Glucosestandardlösung
- 3) unbekannte Probe: 5,0 ml Glucose-Reagens
0,2 ml enteiweißte Probe

Die Ansätze werden durch mehrfaches Umschwenken gut ge-
mischt und bleiben 30 - 40 min bei Raumtemperatur stehen.
Danach werden die Extinktionen der Probe und des Glucose-
Standards gegen den Reagentien-Leerwert mit einer Meß-
strahlung von 436 m μ in 10 mm-Küvetten mit einem Photo-
meter (Photometer-Eppendorf, Netheler & Hinz, Hamburg)
gemessen.

Die gemessene Extinktion der Probe wird mit der des Glucose-Standardwertes verglichen. Dieser enthält 18,2 gamma Glucose pro Ansatz, was bei gleicher Extinktion der Probe infolge der Verdünnung bei der Enteiweißung 1,0 mg Glucose in 1,0 ml Probe entspricht. Aufgrund der linearen Abhängigkeit der Extinktion von der Glucosemenge bis in den Bereich von 450 mg% ergibt sich der Glucosegehalt der Probe aus der Gleichung

Extinktion der Probe
Extinktion des Standards $\cdot 100 = \text{mg\% Glucose in der Probe}$

V.C. Bestimmung der Insulinwirkung von Serum und Serum-eiweißfraktionen

Zur Bestimmung der Insulinwirkung wurden drei Verfahren angewandt. Mit dem isolierten epididymalen Rattenfettgewebe wurden sämtliche Seren und Serum-eiweißfraktionen untersucht; für die Bestimmung mit dem isolierten Rattendiaaphragma und mit Hilfe Insulin-bindender Antikörper standen dagegen nur noch ausgewählte Proben zur Verfügung.

1. Bestimmung der Insulinwirkung mit dem isolierten epididymalen Rattenfettgewebe

Das Prinzip der Bestimmung von Insulin im Blut am isolierten epididymalen Rattenfettgewebe wurde von Martin, Renold und Dagenais (1958) angegeben und bei den vorliegenden Untersuchungen in einer von Ditschuneit und Mitarb. (1962) ausgearbeiteten Verbesserung angewandt.

Mit diesem Verfahren wird die unter dem Einfluß von Insulin gesteigerte C^{14}O_2 -Bildung aus $1\text{-C}^{14}\text{-}\alpha\text{-Glucose}$ durch das isolierte, sehr stoffwechselaktive epididymale Rattenfettgewebe gemessen und als Index der Insulinwirkung benutzt.

Erforderliche Reagentien

- (1) Kaliumchlorid, KCl, p.a., o,154 m
- (2) Calciumchlorid, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, p.a., o,110 m
- (3) Magnesiumsulfat, MgSO_4 , p.a., o,154 m
- (4) Kaliumbiphosphat, KH_2PO_4 , p.a., o,154 m
- (5) Natriumbicarbonat, NaHCO_3 , p.a., o,154 m
- (6) Natriumchlorid, NaCl, p.a., o,154 m
- (7) d-Glucose, DAB 6
- (8) 1-C^{14} -d-Glucose, spez. Aktivität ca. 50 $\mu\text{C}/\text{mg}$
- (9) Gelatine, rein
- (10) Oxycarbon, 95% Sauerstoff + 5% Kohlendioxyd
- (11) mehrfach umkrist. Schweine-Insulin, glukagonfrei, spez. Aktivität 25-27 E/mg (Farbwerke Hoechst AG)
- (12) Toluol, C_7H_8 , p.a.
- (13) 1,4-Bis-2(5-Phenyloxazolyl)-Benzene (POPOP)
- (14) 2,5-Diphenyloxazol (POP)
- (15) Hyamin-hydroxyd, 1 m in Methanol
- (16) Schwefelsäure, 10%
- (17) Alkohol, 95%
- (18) Salzsäure, 1/300 n

Herstellung der Lösungen

- (I) Krebs-Ringer-Bikarbonat-Pufferlösung (pH = 7,4) mit Zusatz von Gelatine (200 mg%):
- Die Pufferlösung nach Krebs (1932) und Ringer (1886) hat folgende Zusammensetzung:
- 3,0 ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (o,110 m)
 4,0 ml KCl (o,154 m)
 1,0 ml MgSO_4 (o,154 m)
 1,0 ml KH_2PO_4 (o,154 m)
 100,0 ml NaCl (o,154 m)
- ca. 5 min mit Oxycarbon durchströmen
- 21,0 ml NaHCO_3 (o,154 m)
 26,0 mg Gelatine (rein)
- Diese 200 mg% Gelatine-Pufferlösung wird täglich frisch zubereitet. Das zur Herstellung der Stammlösungen (s.: Erforderliche Reagentien 1 - 6) ver-

wendete Wasser wird in Quarzapparaturen doppelt destilliert.

Zur vollständigen Lösung der Gelatine ist eine leichte Erwärmung des Puffers erforderlich. Die dadurch eintretende pH-Verschiebung zur alkalischen Seite infolge einer Verminderung des Kohlendioxydgehaltes wird durch erneute Durchströmung mit Oxycarbon korrigiert und der pH-Wert mit einem elektrisch anzeigenden pH-Meter mit Glaselektrode (Dr. A. Kuntze, Düsseldorf) kontrolliert.

(II) $1-C^{14}$ -d-Glucose (0,25 μ C/ml):

Die vom Radiochemical Centre Amersham, Buckinghamshire, England bezogene radioaktiv markierte Glucose mit einer Aktivität von jeweils 0,1 mC wird in 400,0 ml Aqua bidest. gelöst und in Portionen von 3,0 ml bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

(III) Insulinlösungen:

1) Insulinstammlösung (50E/ml)

10,0 mg krist. Schweine-Insulin in 5,0 ml 1/300 n HCl gut lösen (eine Woche lang bei $+4^{\circ}\text{C}$ haltbar).

2) Standardlösung mit 1E/ml

1,0 ml Insulinstammlösung mit 1/300 n HCl auf 50,0 ml verdünnen.

3) Standardlösung mit 10 mE/ml

1,0 ml der Standardlösung 2) mit Gelatine(200mg%)- und Glucose(250mg%)-haltiger Krebs-Ringer-Pufferlösung auf 100,0 ml verdünnen.

4) Standardlösung mit 1000 μ E/ml

4,0 ml der Standardlösung 3) mit der gleichen Pufferlösung auf 40,0 ml verdünnen.

5) Standardlösung mit 50 μ E/ml

2,0 ml der Standardlösung 4) mit der gleichen Pufferlösung auf 40,0 ml verdünnen.

Der pH-Wert der Insulinstandardlösungen (mit 1000 und 50 μ E/ml) wird kontrolliert und eventuell mit mit Oxycarbon durchströmung auf pH 7,4 korrigiert.

(IV) Szintillatorlösung:

3,0 g POPOP + 0,1 g POP mit Toluol auf 1000,0 ml auffüllen.

Erforderliche Geräte

- (1) ca. 4 cm hohe zylindrische Inkubationsgefäße aus Glas mit Normalschliff 24 und entsprechenden Gummistopfen, die von zwei kurzen, mit Gummikappen verschlossenen Glasröhren durchbohrt sind. An der Unterseite der Verschlüsse sind an einem Stahldraht (V2A) toluolbeständige, farblose Plastikschälchen aufgehängt.
- (2) Schüttelwasserbad mit Thermostat ($38 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$)
- (3) Analysenwaage, halbautomatisch, Empfindlichkeit $\pm 0,05\text{mg}$
- (4) Flüssigkeitsszintillationszähler, LSG 10B, Tracerlab/USA
- (5) Tuberculinspritze
- (6) Kanülen No. 12

Arbeitsweise

Zu jedem Bestimmungsansatz werden 12 Inkubationsgefäße (für 6 Doppelbestimmungen) benutzt. In die Versuchsreihe mit 6 Fläschchenpaaren werden zunächst je 0,1 ml von der $1\text{-C}^{14}\text{-d-Glucose}$ ($0,025/\mu\text{C}$) und anschließend in das erste Fläschchenpaar 1,9 ml Standardinsulinlösung mit $1000/\mu\text{E/ml}$ und in das zweite Fläschchenpaar 1,9 ml Standardinsulinlösung mit $50/\mu\text{E/ml}$ pipettiert. In die weiteren vier Fläschchenpaare pipettiert man je 1,0 ml von vier zu bestimmenden Serumproben oder Serumeiweißfraktionen ($\text{pH}=7,4$) sowie 0,9 ml Gelatine($200\text{mg}\%$)-haltige Pufferlösung ohne und mit Glucosezusatz ($500\text{mg}\%$). Die Menge der Glucose-haltigen Pufferlösung wird dabei so gewählt, daß der Zuckergehalt der gesamten Proben - unter Berücksichtigung des Glucosewertes des Serumanteils - $250\text{ mg}\%$ beträgt. Die Serumproben und Serumeiweißfraktionen werden also in einer Verdünnung von 1:2 untersucht (alle mit dem isolierten epididymalen Fettgewebe gewonnenen Ergebnisse wurden unter diesen Bedingungen erhalten).

Die zur Untersuchung benötigten Fettzipfel werden von 150-180 g schweren, bis zum Versuchsbeginn ad libitum

gefütterten Ratten gewonnen. Die Tiere werden durch Nackenschlag getötet und entblutet. Nach der Eröffnung der Bauchhöhle kann der meist fingerförmig in drei Zipfel gegliederte epididymale Fettanhang mit einer Pinzette am Hoden bequem herausgehoben und in drei nahezu gleichgroße Teile von ca. 40-50 mg zerlegt werden. Man gewinnt so von jeder Ratte insgesamt 6 Zipfel. In jedes Inkubationsgefäß werden 3 Fettzipfel von drei verschiedenen Ratten unter größtmöglicher Schonung des Gewebes hineingeschnitten. Für einen Ansatz von 6 Doppelbestimmungen benötigt man also insgesamt 6 Ratten. Vor und nach der Zugabe der Fettzipfel werden die Gläser zur Bestimmung des Gesamtgewichtes der Fettanhänge mit einer Analysenwaage gewogen.

Die fest verschlossenen Inkubationsfläschchen werden mit Hilfe von Kanülen, die in die Gummikappen der Verschlüsse eingestochen werden, 5-10 min lang mit Oxycarbon (95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxyd) durchströmt und anschließend 2 1/2 Stunden lang im Schüttelwasserbad bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 90 Stößen pro Minute inkubiert. Nach der Inkubation spritzt man ohne Eröffnung der Gefäße 0,2 ml Hyamin-hydroxyd durch die Glasröhrchen in die am Gummiverschluß aufgehängten Plastikschälchen und 0,3 ml Schwefelsäure (10%) in das Inkubationsmedium. Das sich entwickelnde Kohlendioxyd (aus radioaktiv markierter und unmarkierter Glucose) wird im Laufe einer Stunde vollständig durch das Hyamin-hydroxyd adsorbiert.

Die Plastikschälchen mit dem Hyamin-hydroxyd werden dann in die mit 10,0 ml Szintillationsflüssigkeit und 2,0 ml Alkohol gefüllten Schraubgläser geworfen. Die darin enthaltene Radioaktivität (Impulse/Minute) des gesamten $C^{14}O_2$ wird mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen, auf das Fettgewicht bezogen (Gewicht in mg) und aus diesem die Quadratwurzel errechnet.

Die Messung der Radioaktivität von C^{14} in flüssiger Form ist möglich, da die dem Lösungsmittel (Toluol) zugesetzte organische Substanz (POPOP) durch die beta-Strahlung des C^{14} zur Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichtes angeregt wird. Die entstehenden Lichtblitze werden von Photomultipliern aufgenommen. Die Verwendung flüssiger Szintillatoren setzt die Löslichkeit der Probe in Toluol oder anderen organischen Lösungsmitteln voraus. In dieser Versuchsanordnung wird die Bedingung durch Verwendung von Hyamin-hydroxyd als Adsorptionsmittel für das entstehende $C^{14}O_2$ erfüllt. Durch die kleine Menge zugesetzten Alkohols (2,0 ml), die eine Trübung der Szintillatorlösung durch Wasser vermeiden soll, wird der Wirkungsgrad der Zählung nur unbedeutend von 78% auf 74% vermindert, sodaß sich nach Zugabe der Zählprobe ein Gesamtwirkungsgrad der Aktivitätsmessung von 71% ergibt (Ditschuneit u. Mitarb., 1962).

Da der Dosis-Wirkungsbeziehung eine exponentielle Abhängigkeit mit linearer Regression zwischen dem Logarithmus der Insulinkonzentration und der Quadratwurzel aus den auf das Fettgewicht (mg) bezogenen Impulszahlen zugrunde liegt, lassen sich die Insulinwirkungen der unbekannten Proben am besten graphisch ermitteln. An der Verbindungsgeraden zwischen den Quadratwurzeln der ermittelten Insulineffekte der beiden Standardinsulinlösungen mit 1000 und 50 $\mu E/ml$ kann man die gesuchten Insulinwirkungen leicht ablesen.

2. Bestimmung der Insulinwirkung mit dem isolierten Rattendiaphragma

Bei dem von Groen und Mitarb. (1952) eingeführten Verfahren wird die isolierte Rattenzwerchfellhälfte zur Bestimmung von Insulin benutzt. Als Parameter für die Insulinwirkung dient die durch Insulin gesteigerte Glucoseaufnahme des Hemidiaphragma. In den vorliegenden Unter-

suchungen wurde als Vergleich für die unbekannten Insulinwirkungen die Netto-Glucoseaufnahme von 1000 μ E Rinder-Insulin pro ml herangezogen.

Erforderliche Reagentien

- (1) Kaliumchlorid, KCl, p.a.
- (2) Natriumchlorid, NaCl, p.a.
- (3) Calciumchlorid, CaCl_2 (anhydr.), p.a.
- (4) Magnesiumchlorid, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, p.a.
- (5) Kaliumsulfat, K_2SO_4 , p.a.
- (6) Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 , p.a.
- (7) Dikaliumhydrogenphosphat, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, p.a.
- (8) Natriumbicarbonat, NaHCO_3 , p.a.
- (9) d-Glucose, DAB 6
- (10) Gelatine, rein
- (11) Oxycarbon, 95% Sauerstoff + 5% Kohlendioxyd
- (12) mehrfach umkrist. Rinder-Insulin, glucagonfrei, spez. Aktivität 25-27 E/mg (Farbwerke Hoechst AG)

Herstellung der Lösungen

- (I) Stammlösungen für die Gey-und-Gey-Pufferlösung:
 - (a) Natriumchlorid-Lösung
28,55 g NaCl mit Aqua bidest. auf 100,0 ml auffüllen.
 - (b) Kaliumchlorid-Lösung
10,65 g KCl mit Aqua bidest. auf 100,0 ml auffüllen.
 - (c) Calciumchlorid-Lösung
7,5 g CaCl_2 (anhydr.) mit Aqua bidest. auf 100,0 ml auffüllen.
 - (d) Magnesiumchlorid-Lösung
13,2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ mit Aqua bidest. auf 100,0 ml auffüllen.
 - (e) Kaliumsulfat-Lösung
2,615 g K_2SO_4 mit Aqua bidest. auf 100,0 ml auffüllen.
 - (f) Kaliumdihydrogenphosphat-Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung
1,705 g KH_2PO_4 + 8,55 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ mit Aqua

bidest. auf 500,0 ml auffüllen.

(g) Natriumbicarbonat-Lösung

11,45 g NaHCO_3 mit Aqua bidest. auf 500,0 ml auffüllen.

(II) Gey-und-Gey-Pufferlösung (pH=7,4) mit Zusatz von Gelatine (200 mg%):

Die von Gey und Gey (1936) beschriebene Pufferlösung hat folgende Zusammensetzung:

10,0 ml NaCl -Lösung

1,0 ml KCl -Lösung

1,0 ml CaCl_2 -Lösung

4,0 ml $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -Lösung

1,0 ml K_2SO_4 -Lösung

5,0 ml KH_2PO_4 - $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -Lösung

ca. 5 min mit Oxycarbon durchströmen

50,0 ml NaHCO_3 -Lösung

10000 mg Gelatine, rein

Die Mischung mit Aqua bidest. auf 500,0 ml auffüllen.

Die Zubereitung erfolgt unter den gleichen Bedingungen wie die der Krebs-Ringer-Bicarbonat-Pufferlösung (vgl. Abschn. V.C.1.).

(III) Insulinlösungen:

Die Zubereitung der Rinder-Insulinlösungen erfolgt nach den gleichen Vorschriften wie die der Schweine-Insulinlösungen (vgl. Abschn. V.C.1.).

Arbeitsweise

In jedem Versuchsansatz werden neben der Glucoseaufnahme unbekannter Proben auch die Werte von Gelatine(200 mg%)- und Glucose(200 mg%)-haltiger Pufferlösung und von Glucose(200 mg%)-haltiger Standardinsulinlösung mit 1000 $\mu\text{E}/\text{ml}$ bestimmt. Alle Untersuchungen werden 5-10 fach durchgeführt und aus den Einzelergebnissen der Mittelwert berechnet.

In die in Abschnitt V.C.1. beschriebenen Inkubationsfläschchen werden jeweils 1,5 ml der zu bestimmenden Probe (200 mg% Glucosegehalt), der Standardinsulinlösung

oder des Glucose(200 mg%)-haltigen Puffers (pH jeweils =7,4) pipettiert (5-10 Gläser für jede Probe).

Die Zwerchfelle werden 24 Stunden lang hungernden Ratten (Gewicht ca. 150 g) entnommen. Die Tiere werden durch Nackenschlag getötet und entblutet. Nach Eröffnung des Abdomens wird das Zwerchfell unter größtmöglicher Schonung des Gewebes mit einer gebogenen Schere dicht an der Thoraxwand abgetrennt. Es wird in 2 nach Möglichkeit gleichgroße Teile geteilt, die vor der Inkubation mit dem Testmedium 15 min lang in eisgekühlter Gey-und-Gey-Pufferlösung aufbewahrt werden. Jedes Fläschchen wird dann mit einer Zwerchfelloberhälfte beschickt, 5-10 min lang mit Oxygencarbon durchströmt und 90 min lang im Schüttelwasserbad bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 90 Stößen pro Minute inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation werden die Zwerchfelloberhälften herausgehoben, 2 Stunden lang bei 90°C im Trockenschrank getrocknet und dann gewogen. Der Glucosegehalt aller Proben wird vor und nach der Inkubation nach der Methode von Huggett und Nixon (1957a,b) bestimmt und die Glucoseaufnahme der in den Proben inkubierten Zwerchfelloberhälften auf 10 mg Trockengewicht berechnet.

Die Glucoseaufnahme der in den unbekannten Proben und in der Standardinsulinlösung inkubierten Zwerchfelloberhälften wird mit der in Glucose(200 mg%)-haltiger Pufferlösung gemessenen Glucoseaufnahme ("Basalaufnahme") verglichen (Differenz:"Netto-Glucoseaufnahme").

3. Bestimmung der Insulinwirkung mit Insulin-bindenden Antikörpern

Die auf den bindenden Eigenschaften von Insulinantikörpern beruhende immunologische Methode zur Bestimmung von Insulin im Blut wurde nach den Angaben von Yalow und Berson (1960) durchgeführt.

Als Maß für die Insulinwirkung gilt dabei das Verhältnis von an Antikörper gebundenem zu freiem Jod-131-markiertem Insulin (bound/free; B/F). Dies Verhältnis wird durch steigende Mengen von unmarkiertem Insulin, das die Bindung des Jod-131-markierten Insulins an Insulinantikörper kompetitiv hemmt, umgekehrt proportional beeinflusst.

Die Trennung in freies und Antikörper-gebundenes Insulin (markiert und unmarkiert) wurde auf zwei Wegen durchgeführt.

Bei der von Melani u. Mitarb. (1963a) benutzten Methode läßt sich das mit den beta- und gamma-Globulinen wandernde Antikörper-gebundene Insulin von dem mit den alpha-Globulinen und Albuminen wandernden freien Insulin auf einer Agargelschicht elektrophoretisch gut trennen. Die Aktivität der beiden Teile (gebundenes und freies Jod-131-markiertes Insulin) kann mit einem Flüssigkeits-szintillationszähler leicht ermittelt werden.

Das von Meade und Klitgaard (1962) angegebene Verfahren benutzt zur Trennung einen Dowex-Anionenaustauscher, der das freie Insulin adsorbiert. Durch Ermittlung der Gesamtaktivität der Probe und des nach Zentrifugation im Überstand bleibenden gebundenen Anteils mit Hilfe eines Szintillationszählers läßt sich der Faktor B/F errechnen.

a. Inkubation von Probe, Insulinantikörper und Jod-131-markiertem Insulin

Erforderliche Reagentien

- (1) Diäthylbarbitursäures Natrium, DAB 6
- (2) Gelatine, rein
- (3) Salzsäure, p.a., 0,1 n
- (4) Jod-131-markiertes Schweine-Insulin, spez. Aktivität 6-20 mC/mg
- (5) mehrfach umkrist. Schweine-Insulin, glucagonfrei, spez. Aktivität 25-27 E/mg (Farbwerke Hoechst AG)

- (6) Meerschweinchen-Anti-Schweine-Insulin-Serum
(vgl. Abschnitt V.F.)

Herstellung der Lösungen

- (I) Veronalnatrium-Pufferlösung mit Gelatine(200 mg%)-Zusatz:
20,6 g diäthylbarbitursaures Na mit Aqua bidest. auf 1000,0 ml auffüllen. 871,0 ml der gewonnenen Lösung + 2,0 g Gelatine mit HCl (0,1 n) auf 1000,0 ml auffüllen.
Die Pufferlösung hat einen pH-Wert von 8,6 und eine Ionenstärke von 0,1.
- (II) Insulinlösungen:
Die Zubereitung der Schweine-Insulinlösungen erfolgt nach derselben Vorschrift wie in Abschnitt V.C.1. unter Verwendung des Veronalnatrium-Puffers mit Gelatine(200 mg%)-Zusatz. Die Standardinsulinlösung mit einem Gehalt von 1000 μ E/ml (vgl. Abschn. V.C.1.) wird durch entsprechende weitere Verdünnungen mit derselben Pufferlösung auf Standardinsulinlösungen mit einem Gehalt von 500, 250, 100, 50, 20, 10 und 5 μ E/ml gebracht.
- (III) Anti-Insulinserum-Verdünnung:
0,2 ml Antiserum (vgl. Abschn. V.F.) mit 250,0 ml Gelatine(200 mg%)-haltiger Veronalnatrium-Pufferlösung auf 1:1250 verdünnen.
- (IV) Verdünnung des Jod-131-markierten Insulins:
Das von den Farbwerken Hoechst AG bezogene Jod-131-markierte Insulin wird entsprechend dem vorhandenen Insulingehalt (mg/ml) mit Pufferlösung über mehrere Stufen auf einen Endgehalt von 500 und 100 μ E Jod-131-markierten Insulins pro ml verdünnt.

Arbeitsweise

Wird die Trennung auf dem Agargel vorgenommen, so werden pro Versuchsansatz 0,5 ml Probe (Serum oder Standardinsulinlösungen mit einem Gehalt von 1000, 500, 250, 100, 50,

und $20\text{ }\mu\text{E/ml}$), $0,5\text{ ml}$ Antiserum ($1:1250$ verdünnt) und $0,1\text{ ml}$ Jod- 131 -markiertes Insulin ($500\text{ }\mu\text{E/ml}$) in ein Wassermannröhrchen pipettiert. In den Teströhrchen liegen dann die Proben in einer Konzentration von $500, 250, 125, 50, 25$ und $10\text{ }\mu\text{E/ml}$ ($1:2$ verdünnt), das Antiserum $1:2500$ verdünnt und das Jod- 131 -markierte Insulin in einer Konzentration von $50\text{ }\mu\text{E/ml}$ vor.

Zur Trennung mit dem Dowex-Ionenaustauscher pipettiert man in jedes Röhrchen $1,0\text{ ml}$ $1:5$ verdünntes Serum bzw. Standardinsulinlösung ($1000, 500, 250, 100, 50, 20, 10$ und $5\text{ }\mu\text{E/ml}$) und $1,0\text{ ml}$ einer Mischung aus $1:1250$ verdünntem Antiserum mit $0,1\text{ ml}$ Jod- 131 -markiertem Insulin ($100\text{ }\mu\text{E/ml}$). Die Endkonzentration im Versuchsansatz beträgt dann neben dem $1:10$ verdünnten Serum für die Standardinsulinlösungen $500, 250, 125, 50, 25, 10, 5$ und $2,5\text{ }\mu\text{E/ml}$, für das Antiserum eine Verdünnung von $1:2500$ und für das Jod- 131 -markierte Insulin eine Konzentration von $5\text{ }\mu\text{E/ml}$.

b. Trennung in freies und Antikörper-gebundenes Insulin

Erforderliche Reagentien

- (1) Diäthylbarbitursaures Natrium, DAB 6
- (2) Salzsäure, p.a., $0,1\text{ n}$
- (3) Eisessig, CH_3COOH , p.a., ca. 2%
- (4) Natriumhydroxyd, NaOH , p.a., 2 n
- (5) Agar, rein (Difco Laboratories, Detroit, USA)
- (6) Dowex 1, rein, Siebzahl $200-400\text{ mesh}$, (Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg)
- (7) Szintillatorlösung (vgl. Abschn. V.C.1.)

Herstellung der Lösungen

- (I) Veronalnatrium-Pufferlösung:

Die Herstellung erfolgt wie in Abschn. V.C.3.a., jedoch ohne Gelatine-Zusatz

- (II) Agargel:

$4,0\text{ g}$ Agar mit Aqua bidest. auf $100,0\text{ ml}$ auffüllen,

kochen, durch ein Seidentuch filtern. 1 Teil der jetzt 4%igen Agarlösung + 1 Teil Aqua bidest + 2 Teile Veronalnatrium-Pufferlösung unmittelbar vor Gebrauch mischen und kurz aufkochen.

(III)Dowex-Anionenaustauscher:

Der in Chloridform vorliegende Ionenaustauscher muß in die Hydroxydform übergeführt werden, um eine starke Bindungsfähigkeit für das freie Insulin zu erreichen.

1 Teil Dowex 1 (g) + 8 Teile NaOH 2 n (ml) zwei Stunden lang unter ständigem Schütteln reagieren lassen. Filtern durch einen Sinterfilter und mit Aqua bidest. solange nachwaschen, bis das Filtrat einen pH-Wert unter 8,0 erreicht hat. Die gewonnene Hydroxydform lufttrocknen, im verschlossenen Glasgefäß bei Zimmertemperatur aufbewahren.

Erforderliche Geräte

- (1) Flüssigkeitsszintillationszähler (vgl. Abschn. V.C.1.)
- (2) Bohrloch-Kristalldetektor zur Ermittlung der Radioaktivität von Jod-131-markiertem Insulin (Tracerlab, USA)
- (3) Sinterfilter

Arbeitsweise

Zur Trennung im Agargel werden Objektträger mit 3,0 ml des erwärmten Agargels bedeckt. Mit einem schmalen Filterpapierstreifen (ca. 2,0 • 0,5 cm) werden ungefähr 0,02 ml des Versuchsansatzes (0,5 ml Serum bzw. Standardinsulinlösung, 0,5 ml Antiserum, 0,1 ml Jod-131-markiertes Insulin), der 3-4 Tage bei +4°C inkubiert wurde, auf den erstarrten Agar aufgebracht. Anschließend werden die Versuchsansätze bei einer Feldstärke von 2,5 V/cm elektrophoretisch in ihre Eiweißfraktionen getrennt. Infolge der starken Elektroendosmose im Agargel wandern die beta- und gamma-Globuline und mit ihnen der an Antikörper gebundene Anteil des Insulins zur Kathode, der freie Insulinanteil mit den alpha-Globulinen und

Albuminen zur Anode (dabei wird ein geringer Teil des freien Insulins vom Filterpapierstreifen absorbiert). Nach einer Laufzeit von 1 Stunde werden die Proteine einer Vergleichsprobe mit Eisessig (ca. 2%) gefällt, wobei die einzelnen Proteinfractionen (gamma-, beta- und alpha-Globuline sowie Albumine) zur Darstellung kommen. Nach diesem Muster wird die Agargelschicht der einzelnen Versuchsansätze an der kathodischen Seite des Filterpapierstreifens in zwei Teile auseinander-geschnitten (gebundenes und freies Insulin) und die Radioaktivität beider Teile nach Einfrieren und Auftauen (zur Zerstörung des Agar) mit einem Flüssigkeits-szintillationszähler bestimmt (vgl. Abschn. V.C.1.).

Für die Trennung mit dem Ionenaustauscher werden die Versuchsansätze (1,0 ml 1:5 verdünnten Serums bzw. 1,0 ml Standardinsulinlösung, 1,0 ml Mischung aus 1:1250 verdünntem Antiserum und 0,1 ml Jod-131-markiertem Insulin mit 10 μ E/ml) nur 24 Stunden bei +4°C inkubiert. Den Mischungen werden 200 mg des vorbereiteten Ionenaustauschers zugesetzt und die Gesamtaktivität der Mischung (Impulse/Minute) mit einem Szintillationszähler (Bohrloch-Kristalldetektor) bestimmt. Dann wird die Mischung 1 Stunde lang im Schüttelwasserbad bei 25°C und einer Schüttelfrequenz von 180 Stößen pro min geschüttelt. Dabei adsorbiert der Ionenaustauscher das freie Insulin. Nach Zentrifugation befindet sich das Antikörper-gebundene Insulin im Überstand. Die darin vorhandene Radioaktivität wird mit dem gleichen Bohrloch-Kristalldetektor bestimmt.

Das Verhältnis des Antikörper-gebundenen (B) zum freien (F) Jod-131-markierten Insulin (B/F) läßt sich aus den mit beiden Trennungsmethoden ermittelten Werten leicht berechnen. Da zwischen dem Verhältnis B/F und der Insulinkonzentration eine hyperbolische Gesetzmäßigkeit besteht, bilden die für die Standardinsulinlösungen gefundenen Werte im doppeltlogarithmischen Koordinatensystem eine Gerade, an der die Insulinwerte der unbekannten Proben abgelesen werden können.

V.D. Zonenelektrophoretische Darstellung von Serum-eiweißfraktionen

Die zonenelektrophoretische Präparation von Serumeiweißkörpern basiert auf den Angaben von Kunkel und Slater (1952) und wurde mit den hier angewandten Verbesserungen ausführlich von Cuendet (1962) beschrieben. Als Träger wird ein hydrophiles Kunststoffpulver aus Polyvinylchlorid benutzt, das Insulin nicht adsorbiert und sich gegen Laugen und Säuren vollkommen inert verhält. Nach der Trennung kann das Pulver mit Wasser gewaschen und für weitere Versuche verwendet werden. Die endosmotische Flüssigkeitsverschiebung in Richtung zur Kathode stört die Trennung der anodenwärts wandernden Eiweißkörper nicht wesentlich.

Erforderliche Reagentien

- (1) Krebs-Ringer-Bicarbonat-Pufferlösung (vgl. Abschn.V.C.1)
- (2) Polyvinylchlorid-Pulver, Geon X427, Serva-Entwicklungslabor Heidelberg

Erforderliche Geräte

- (1) Apparatur zur zonenelektrophoretischen Auftrennung von Serumeiweißfraktionen mit Umwälzpumpe, Kühlsystem und Spannungsquelle
- (2) Sinterfilter
- (3) Apparatur zur Lyophilisation, Fassungsvermögen 6000 ml, Edwards, Hochvakuum G.m.b.H., Frankfurt/Main

Arbeitsweise

Der Träger wird aus Polyvinylchlorid(PVC)-Pulver und Pufferlösung zubereitet und in einer 1 cm dicken Schicht auf die gekühlte Bodenplatte der Elektrophoreseapparatur (70 x 40 cm) aufgebracht. Nach ca. 1 Stunde wird die sich auf der Oberfläche des Breies absetzende (überschüssige) Flüssigkeit mit Filterpapier aufgesaugt. Die Fläche wird mit einem Glasstab in zwei Hälften geteilt, in denen senkrecht

zur Wanderungsrichtung der Eiweisskörper je ein V-förmiger Graben aus dem feuchten Träger ausgehoben wird.

Zwei Serumprouben von je 8 ml werden 8-12 Stunden lang gegen Krebs-Ringer-Bicarbonat-Pufferlösung dialysiert, anschliessend mit trockenem PVC-Pulver zu je einem dünnflüssigen Brei vermengt und in die V-förmigen Gräben gegossen. Die Oberfläche des Trägers wird mit einer Glasplatte luftdicht abgedeckt und während des gesamten Trennungsvorganges mit einem eisgefüllten Metallbehälter gekühlt.

Die Auftrennung erfolgt mit einer Spannung von 4 V/cm bei einer Stromdichte von ca. 100 mA. Nach einer Laufzeit von 24 Stunden wird mit einem Filterpapierstreifen ein Abdruck der Trägeroberfläche angefertigt. Mit Hilfe des mit Amidoschwarz gefärbten Streifens lassen sich die verschiedenen Eiweissfraktionen im Trägergut lokalisieren. Sie werden getrennt aus dem Brei herausgeschnitten und mit einem Sinterfilter mit ca. 100.0 ml Aqua dest. unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe leicht eluiert. Die einzelnen Eiweissfraktionen werden dann lyophilisiert und unmittelbar vor der Bestimmung ihrer Insulinwirkung in 8 ml Aqua bidest. aufgelöst. Eine kleine Menge der gelösten Fraktionen wird papierelektrophoretisch auf die Reinheit der Trennung untersucht.

V.E. Papierelektrophoretische Darstellung von Serumeiweissfraktionen

Die Reinheit der zonenelektrophoretisch gewonnenen Serumeiweissfraktionen wurde mit der von Grassmann u.M. (1951) beschriebenen Papierelektrophorese geprüft.

Erforderliche Reagentien

- (1) Diäthylbarbituraures Natrium, DAB 6
- (2) Salzsäure, HCl, p.a., 0.1n
- (3) Methanol, CH₃OH, p.a.
- (4) Eisessig, CH₃COOH, p.a. ca 96%
- (5) Amidoschwarz 10 B

Herstellung der Veronalnatrium-Pufferlösung

Die Herstellung erfolgt wie in Abschnitt V.C.3.a., jedoch ohne Gelatine-Zusatz.

Arbeitsweise

Als Träger dienen horizontal angeordnete Papierstreifen von Schleicher und Schüll (Nr. 2043 a, maschinenglatt). In einer selbstgefertigten Apparatur tauchen sie mit den Enden in Veronalnatrium-Pufferlösung. Eine kleine Menge der Probe wird mit einer Glaskapillare senkrecht zur Wanderungsrichtung in der Nähe der Kathode auf den Papierstreifen aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 18 Stunden bei einer Feldstärke von 4 V/cm werden die Papierstreifen im Trockenschrank getrocknet. Die Proteinfraktionen werden mit einer gesättigten Lösung von Amidoschwarz 10 B in Methanol und Eisessig (9:1) gefärbt. Der überschüssige, nicht an Eiweisskörper gebundene Farbstoff wird in Methanol-Eisessig-Wasser-Lösungen mit fallendem Methanolgehalt (8:1:1, 4:1:5, 2:1:7) wieder ausgewaschen.

V.F. Präparation von Insulin-Anti-Serum

Das Anti-Insulin-Serum wurde nach der von Wright (1959) und Robinson und Wright (1961) beschriebenen Methode von Meerschweinchen gewonnen.

Erforderliche Reagentien

- (1) Mehrfach umkrist. Schweine-Insulin, glukagonfrei, spez. Aktivität 25 - 27 E/mg, Farbwerke Hoechst AG
- (2) Arlacel A, Mannide mono-oleate, Atlas Powder Company, Wilmington, USA
- (3) Esso-Bayol F (Paraffin-Öl)
- (4) Tuberkel-Bakterien (abgetötet)
- (5) Salzsäure, HCl, p.a., 1/300 n

Herstellung der Lösungen

(I) Freund'sches Adjuvans:

1,5 ml Arlacel A + 8,5 ml Esso-Bayol F mit fallenden Mengen von Tuberkel-Bakterien (80, 60, 40 oder 0 mg) mischen.

(II) Insulin-Antigen:

10 mg Schweine-Insulin + 10 ml 1/3000 HCl + 10 ml
 Freund'sches Adjuvans (mit 80, 60, 40 oder 0 mg
 Tuberkel-Bakterien)

Arbeitsweise

Einer Gruppe von 6 - 12 Albino-Meerschweinchen (300 - 400 g) werden 4 - 6 mal in wöchentlichen Abständen jeweils 2 ml des frisch präparierten Insulin-Antigens zur Hälfte zwischen die Schultern, zur Hälfte in die Flanken und in die Innenseite der Oberschenkel subcutan injiziert. Zwei Wochen nach der letzten Injektion wird durch Herzpunktion möglichst viel Blut (im Mittel 10 ml) von den Tieren gewonnen. Die abzentrifugierten Seren einer Versuchsgruppe werden vereinigt und in kleinen Portionen bei -20°C aufbewahrt.

Zur Untersuchung des Bindungsvermögens wird dem gewonnenen Insulin-Antiserum eine kleine Menge Jod-131-markierten Schweine-Insulins zugesetzt. Das an die Insulin-Antikörper gebundene Jod-131-markierte Insulin wird mit Hilfe der Papierelektrophorese (vgl. Abschn. V.E.) oder des Harzionenaustauschers (vgl. Abschn. V.C.3.b) vom freien Jod-131-markierten Insulin getrennt und seine Radioaktivität mit einem Szintillationszähler bestimmt.

V.E. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde nach den Vorschriften von Student (1908), Fisher (1938), Koller (1940, 1943) und Weber (1948) vorgenommen. Im einzelnen wurden folgende Gleichungen zugrunde gelegt:

1. Berechnung des Mittelwertes (M) einer Versuchsserie:

$$M = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

X = Einzelbeobachtung
 n = Anzahl der Einzelbeobachtungen
 i = 1.....n

2. Berechnung der Standardabweichung (σ):

$$\sigma = \sqrt{\frac{S}{n-1}}$$

$$S = \sum_{i=1}^n X_i^2 - M \sum_{i=1}^n X_i$$

3. Berechnung der Standardabweichung des Mittelwertes (σ_M):

$$\sigma_M = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

4. Berechnung der Signifikanz eines Mittelwertes:

Der t-Wert der Verteilung nach Student (1908) wurde ~~errech-~~net und die Signifikanzschranke für (p) unter dem Freiheitsgrad $n-1$ den Wissenschaftlichen Tabellen Geigy (1960) entnommen.

$$t = \frac{M}{\sigma_M}$$

5. Berechnung der Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte:

Hierzu wurde der t-Wert der Verteilung nach Student (1908) berechnet und die Signifikanzschranke für (p) unter dem Freiheitsgrad $n_1 + n_2 - 2$ den Wissenschaftlichen Tabellen Geigy (1960) entnommen.

$$t = \frac{D}{S_D}$$

$$D = M_1 - M_2$$

$$S_D = \sqrt{\frac{S_{M_1}^2}{n_1} + \frac{S_{M_2}^2}{n_2}}$$

$$S_{M_1 M_2}^2 = \frac{S_1 + S_2}{n_1 + n_2 - 2}$$

VI. Ergebnisse

Die Resultate unserer Untersuchungen sind in den Abb. 2-4 summarisch dargestellt, die Einzelergebnisse werden in den Tab. 1-15 des Anhangs vorgelegt.

VI.A. Versuchsverlauf

Unsere 15 Hunde überstanden die Operationen ohne Komplikationen. Meist nahmen sie schon am ersten postoperativen Tag das angebotene Futter an und erholten sich in den darauffolgenden Tagen gut.

Die 3 pankreatektomierten Hunde der Versuchsgruppe K starben 5, 14 und 15 Tage nach der Operation. Nach dem vierten postoperativen Tag wurden die beiden überlebenden Tiere mit exogenem Insulin behandelt (2 E Alt- und 4 E Depot-Insulin täglich in einer Mischspritze); sie starben während der Hypophysectomie.

Für die 12 Houssay-Hunde der Versuchsgruppe L betrug die Überlebenszeit und damit die Zeit, in der die Tiere ohne Pankreas lebten, 4 - 35 Tage; jedoch nur 4 Hunde starben schon vor dem dreizehnten Tag nach der Pankreatektomie. Die Todesursache war meist ein allgemeiner Kräfteverfall. Mehrere Hunde verweigerten gegen Ende des Versuches die Nahrungsaufnahme. 6 Tiere wurden zu diesem Zeitpunkt getötet und vollständig entblutet.

Bei der autoptischen Untersuchung fanden sich bei den früh gestorbenen Tieren Gehirnblutung (Hund L), eitrige Rhinitis (Hund KB und LE), Peritonitis (Hund LI) und eine beginnende Nekrose der Duodenalschleife (Hund LL). Bei den anderen Tieren wurde keine pathologische Veränderung festgestellt. In allen Fällen konnte die Vollständigkeit der Operationen autoptisch gesichert werden.

Eine Übersicht über den Versuchsverlauf und die Autopsieergebnisse bei den 15 untersuchten Hunden gibt die Tab. 1,

VI.B. Blutzuckerwerte vor und nach Pankreatektomie bzw. vor und nach Hypophysektomie und Pankreatektomie (Versuchsgruppe K und L)

Die im Nüchternzustand bestimmten Blutzuckermittelwerte der beiden Versuchsgruppen K und L betragen vor Versuchsbeginn 72 ± 7 bzw. 65 ± 3 mg% (Tab. 2 und 4). Die Hypophysektomie hat keinen markanten Einfluss auf den Blutzuckerspiegel; die Werte sinken in Gruppe L auf 51 ± 5 bzw. 55 ± 4 mg% (Tab. 4). Nach der Pankreatektomie ist in allen Fällen ein starker Anstieg der Blutzuckermittelwerte auf 235 ± 49 mg% (Gruppe K) bzw. 187 ± 25 bis 289 ± 71 mg% (Gruppe L) festzustellen (Tab. 2 und 4).

VI.C. Serum-Insulinwirkung vor und nach alleiniger Pankreatektomie (Fettgewebsmethode; Versuchsgruppe K)

Bei den 3 nur pankreatektomierten Hunden der Versuchsgruppe K findet sich vor der Operation im 1:2 verdünnten Nüchternserum eine Insulinwirkung von 255 ± 84 μ E/ml (Tab. 3). Zur Verringerung methodischer Fehler wurden die nach der Pankreatektomie gewonnenen Seren im gleichen Versuchsansatz mit den Normalseren untersucht. Der mittlere Seruminsulinspiegel beträgt bei diesen Proben trotz der Behandlung mit exogenem Insulin 103 ± 76 μ E/ml (Tab. 3); dieser Abfall der Serum-Insulinwirkung ist nicht signifikant ($p > 0.05$).

VI. D. Serum-Insulinwirkung vor und nach Hypophysektomie und Pankreatektomie (Versuchsgruppe L)

1. Mit der Fettgewebsmethode gemessene Serum-Insulinwirkung

Auch bei diesen Untersuchungen wurden die vor und nach den Operationen von einem Hund gewonnenen Seren im gleichen Versuchsansatz untersucht. Insgesamt wurden bei den 12 Tieren

der Versuchsgruppe L 187 Untersuchungen ausgeführt.

Die Serum-Insulinwirkung liegt im 1:2 verdünnten Nüchternserum von 11 normalen Hunden bei einem Mittelwert von 420 ± 67 $\mu\text{E/ml}$ (Abb. 2, Tab. 5). Der tiefste gemessene Wert beträgt 30 $\mu\text{E/ml}$, der höchste 1300 $\mu\text{E/ml}$ (Tab. 5).

Wie Abb. 2 und Tab. 5 zeigen, fällt der Mittelwert der Serum-Insulinwirkung eine Woche nach der Hypophysektomie auf 188 ± 36 $\mu\text{E/ml}$ ab. In der zweiten Woche nach der Hypophysektomie findet sich im Mittel ein Wert von 240 ± 42 $\mu\text{E/ml}$. Der tiefste bzw. höchste gemessene Wert nach der Hypophysektomie sind 30 bzw. 1180 $\mu\text{E/ml}$ (Abb. 2, Tab. 5).

Eine Woche nach der nun folgenden Pankreatektomie fällt die Serum-Insulinwirkung bei den 12 Hunden dieser Gruppe L deutlich, aber nicht signifikant gegenüber den Werten nach der Hypophysektomie auf 166 ± 37 $\mu\text{E/ml}$ (tiefster und höchster Wert 20 und 900 $\mu\text{E/ml}$) ab (Abb. 2, Tab. 5).

Auch im Laufe der nächsten Wochen bleibt die Serum-Insulinwirkung annähernd im gleichen Grössenordnungsbereich, ein signifikanter Abfall der Insulinwirkung ist auch nach 5 Wochen noch nicht festzustellen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte betragen in der zweiten Woche nach der Pankreatektomie bei 8 Hunden 209 ± 38 $\mu\text{E/ml}$ (tiefster und höchster Wert 30 und 1000 $\mu\text{E/ml}$), in der dritten Woche bei 6 Hunden 155 ± 18 $\mu\text{E/ml}$ (50 und 330 $\mu\text{E/ml}$) und in der vierten Woche bei 3 Hunden 112 ± 21 $\mu\text{E/ml}$ (30 und 300 $\mu\text{E/ml}$). In der fünften Woche nach der Pankreatektomie ist bei den verbleibenden 2 Hunden noch eine Serum-Insulinwirkung von 140 ± 25 $\mu\text{E/ml}$ (30 und 370 $\mu\text{E/ml}$) nachweisbar (Abb. 2, Tab. 5).

Der Abfall der Serum-Insulinwirkung ist sowohl nach der Hypophysektomie als auch nach der Pankreatektomie gegenüber den Werten im Normalzustand signifikant ($p < 0.05$). Sämtliche

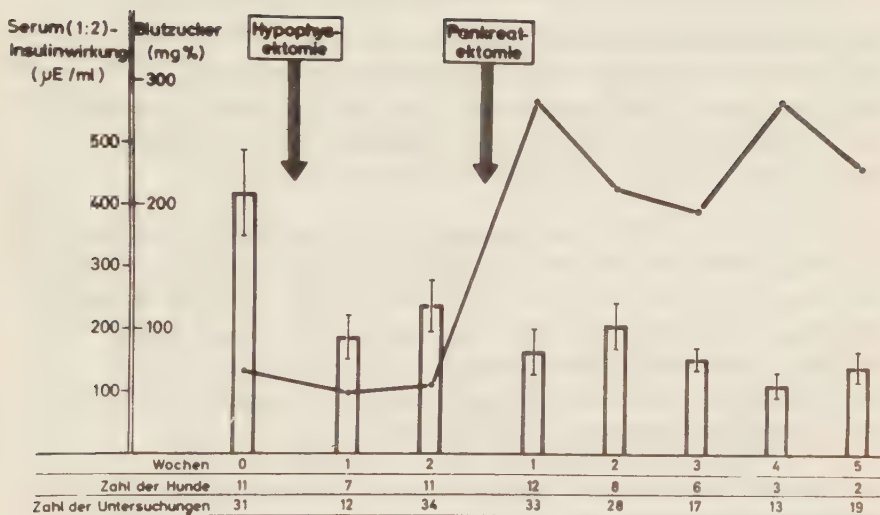


Abb. 2 Einfluss von Hypophysektomie und Pankreatektomie
 auf den Blutzucker und die mit dem Rattenfettgewebe
 gemessene Serum(1:2)-Insulinwirkung bei Hunden

im "Houssay-Stadium" gefundenen Resultate unterscheiden sich dagegen nicht signifikant von den Ergebnissen aus den beiden der Hypophysektomie folgenden Wochen (Abb. 2, Tab. 5).

2. Mit der Diaphragmamethode gemessene Glucoseaufnahme

Die Netto-Glucoseaufnahme des Rattenzwerchfells aus 1:4 verdünnten Seren wird in mg%/10 mg Diaphragmatrockengewicht angegeben und mit dem Mittelwert der Netto-Glucoseaufnahme von 42 Normal-Hundeseren und der Standardinsulinlösung mit 1000 μ E/ml kristallinen Rinder-Insulins verglichen.

Nur von den 6 entbluteten Houssay-Hunden konnten ausreichende Mengen Serum für diese umfangreichen Untersuchungen gewonnen werden. Die 10 - 30, im Mittel 23 mal mit dem Rattendaphragma untersuchten Seren werden in Abb. 3 und Tab. 6 mit den gleichzeitig bestimmten Werten aus Normalserum und Standardinsulinlösung verglichen. Die Gesamtzahl der Diaphragmauntersuchungen beträgt 217.

Für mehrere Normalseren findet sich bei diesen Untersuchungen eine Netto-Glucoseaufnahme von 4.4 ± 0.66 mg%/10 mg Diaphragmatrockengewicht, für 1000 μ E/ml kristallinen Insulins von 5.31 ± 0.58 mg%/mg (Abb. 3, Tab. 6).

Die Werte für die einzelnen Seren der Houssay-Hunde liegen in der ersten Woche nach Pankreatektomie bei 4.38 ± 1.14 mg%/10 mg (Serum von Hund LL), in der zweiten Woche bei 1.82 ± 0.81 mg%/10 mg (Hund LK), in der dritten Woche bei 0.21 ± 0.79 mg%/10 mg (Hund LG) und in der vierten Woche bei -0.96 ± 1.43 mg%/10 mg (Hund LC). Bei den 2 Hunden, die 5 Wochen nach der Pankreatektomie entblutet wurden, beträgt die Netto-Glucoseaufnahme 1.17 ± 0.92 mg%/10 mg (Hund LH) und 2.44 ± 1.02 mg%/10 mg Diaphragmatrockengewicht (Hund LN) (Abb. 3, Tab. 6).

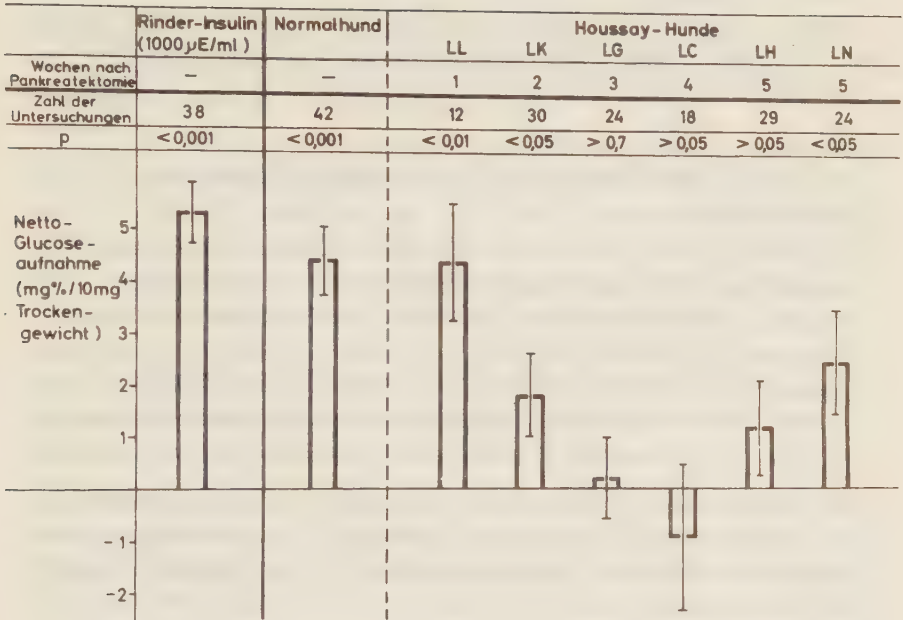


Abb. 3 Einfluss des Serums (1:4 verdünnt) von Houssay-Hunden auf die mit dem Rattendiaphragma gemessene Netto-Glucoseaufnahme

Die Seren, die 1 und 2 Wochen und einmal sogar 5 Wochen nach der Pankreatektomie entnommen wurden (Hunde LL, LK und LN), zeigen also eine signifikante Steigerung der Glukoseaufnahme gegenüber der Basalaufnahme der Diaphragmata aus glukosehaltiger Pufferlösung. Dagegen sind die Seren, die in der dritten und vierten und einmal in der fünften Woche nach der Pankreatektomie entnommen wurden (Hunde LG, LC und LH), nicht in der Lage, die basale Glukoseaufnahme des Diaphragma signifikant zu steigern. Diese 3 Seren enthalten damit keine mit diesem Verfahren nachweisbare Insulinaktivität (Abb. 3, Tab. 6).

3. Mit der immunologischen Methode gemessene Serum-Insulinwirkung

Die Tab. 7 und 8 zeigen die mit der immunologischen Methode bestimmten Serum-Insulinwirkungen. Wie wir im Abschnitt Methodik ausgeführt haben, erschien uns während der Untersuchungen die Umstellung auf ein anderes Trennverfahren notwendig. Die mit beiden Techniken erzielten Resultate werden in Tab. 7 und 8 getrennt dargestellt. Sie können in Bezug auf die absoluten Werte nicht miteinander verglichen werden.

Nach der zunächst verwandten elektrophoretischen Trennung auf Agargel betragen die Insulinwerte im 1:2 verdünnten Serum von 2 Hunden bei Versuchsbeginn 20 ± 4.5 $\mu\text{E/ml}$, nach Hypophysektomie 14 ± 1.4 $\mu\text{E/ml}$ und nach Pankreatektomie 22 ± 4.5 $\mu\text{E/ml}$ (Tab. 7).

Nach Umstellung auf den Dowex-Harzionenaustauscher zur Trennung des freien und Antikörper-gebundenen Jod-131-markierten Insulins ergeben sich im 1:5 verdünnten Serum Werte von 4.2 ± 0.45 $\mu\text{E/ml}$ für 10 Normalhunde, 4.5 ± 0.84 $\mu\text{E/ml}$ für 7 Hunde nach Hypophysektomie und 5.1 ± 0.83 $\mu\text{E/ml}$ für 9 Hoßsay-Hunde (Tab. 8).

Rechnet man die mit den beiden Versuchsmodifikationen im unterschiedlich verdünnten Blut gefundenen Normalwerte auf Vollserum um und vergleicht sie mit den ebenfalls auf den Gehalt im Vollserum umgerechneten Werten von 2 nicht zu diesen Untersuchungen gehörenden Hunden, die mit STH belastet wurden (Tab. 9), dann lässt sich aus diesen Testuntersuchungen

zumindest ein mit der immunologischen Methode nachweisbarer Normalwert von 20 bis 40 $\mu\text{E}/\text{ml}$ für den Hund angeben.

Der fehlende Abfall der Serum-Insulinwirkung nach Hypophysektomie und Pankreatektomie ist wahrscheinlich auf methodische Mängel zurückzuführen. Die möglichen Ursachen dieses negativen Versuchsablaufes werden in der Diskussion dargelegt.

VI.E. Insulinwirkung in zonenelektrophoretisch dargestellten Serumeiweissfraktionen vor und nach Hypophysektomie und Pankreatektomie (Versuchsgruppe L)

Für die zonenelektrophoretische Darstellung der Serumeiweissfraktionen standen uns nur noch von 3 Hunden (LK, LL und LN) ausreichende Serummengen aus dem Normalzustand zur Verfügung. Auch konnten lediglich 2 hypophysektomierte Tiere (LL und LN) und 6 Houssay-Hunde (LC, LG, LH, LK, LL und LN) mit dieser Technik aus dem gleichen Grunde untersucht werden.

1. Mit der Fettgewebismethode gemessene Insulinwirkung

Sämtliche Insulinwirkungen wurden im 1:2 verdünnten Serumeiweissfraktionen bestimmt.

a. Absolute Werte

Die Insulinwirkungen in den aus Normalseren von 3 Hunden dargestellten Serumeiweissfraktionen betragen für die gamma-Globulin-Fraktion $44 \pm 8 \mu\text{E}/\text{ml}$, für die beta-Globulin-Fraktion $161 \pm 38 \mu\text{E}/\text{ml}$, für die α_2 -Globulin-Fraktion $289 \pm 72 \mu\text{E}/\text{ml}$ und für α_1 -Globulin-Albumin-Fraktion $99 \pm 38 \mu\text{E}/\text{ml}$ (Tab. 10).

In der gleichen Reihenfolge sind die Insulinwirkungen bei 2 Hunden nach Hypophysektomie $75 \pm 21 \mu\text{E}/\text{ml}$, $135 \pm 19 \mu\text{E}/\text{ml}$, $200 \pm 45 \mu\text{E}/\text{ml}$ und $168 \pm 30 \mu\text{E}/\text{ml}$ (Tab. 11).

Ebenfalls in der gleichen Reihenfolge angegeben sind die Werte für 6 Houssay-Hunde $75 \pm 10 \mu\text{E}/\text{ml}$, $171 \pm 20 \mu\text{E}/\text{ml}$, $113 \pm 11 \mu\text{E}/\text{ml}$ und $64 \pm 11 \mu\text{E}/\text{ml}$ (Tab. 12).

b. Prozentuale Verteilung

Bei prozentualer Berechnung verteilen sich die Insulinwirkungen in den einzelnen Fraktionen der Normalhunde folgendermassen: gamma-Globulin-Fraktion $7 \pm 1 \%$, beta-Globulin-Fraktion $27 \pm 6 \%$, alpha₂-Globulin-Fraktion $49 \pm 12 \%$ und alpha₁-Globulin-Albumin-Fraktion $19 \pm 6 \%$. Von der an einen Eiweisskörper "gebundenen" Transportform des Insulins (gamma- und beta-Globuline) findet man also $35 \pm 7 \%$, von der "freien" Transportform (alpha-Globuline und Albumine) $65 \pm 17 \%$ (Abb. 4, Tab. 10).

Nach der Hypophysektomie ist in der Verteilung keine Änderung eingetreten. Der "gebundene" Anteil beträgt $36 \pm 6 \%$ (gamma-Globulin-Fraktion $13 \pm 4 \%$, beta-Globulin-Fraktion $23 \pm 3 \%$), der "freie" Anteil $64 \pm 12 \%$ (alpha₂-Globulin-Fraktion $35 \pm 8 \%$, alpha₁-Globulin-Albumin-Fraktion $29 \pm 5 \%$) (Tab. 11).

Nach der Zweitoperation kommt es dann aber zu einer Verschiebung der Insulinwirkung von der "freien" zur "gebundenen" Form des Insulins, sodass das Verhältnis jetzt annähernd umgekehrt ist. Man findet in der gamma-Globulin-Fraktion $18 \pm 2 \%$, in der beta-Globulin-Fraktion $40 \pm 5 \%$ und damit als "gebundenen" Anteil von der gesamten Insulinwirkung $58 \pm 8 \%$. In der alpha₂-Globulin-Fraktion ist der prozentuale Anteil $27 \pm 3 \%$, in der alpha₁-Globulin-Albumin-Fraktion $15 \pm 3 \%$; insgesamt beträgt der "freie" Anteil also nur noch $42 \pm 6 \%$ (Abb. 4, Tab. 12).

2. Mit der Diaphragmamethode gemessene Netto-Glucoseaufnahme

Zur Untersuchung der Netto-Glucoseaufnahme durch das Rattenzwerchfell wurden aufgrund der begrenzten Menge des zur Verfügung stehenden Materials nur 1:4 verdünnte Serumeiweissfraktionen benutzt.

a. Absolute Werte

In den gepoolten Seren von 3 Normalhunden beträgt die Netto-Glucoseaufnahme in der gamma-Globulin-Fraktion $- 2.0 \pm 2.7$ mg%/10 mg Diaphragmatrockengewicht, in der beta-Globulin-

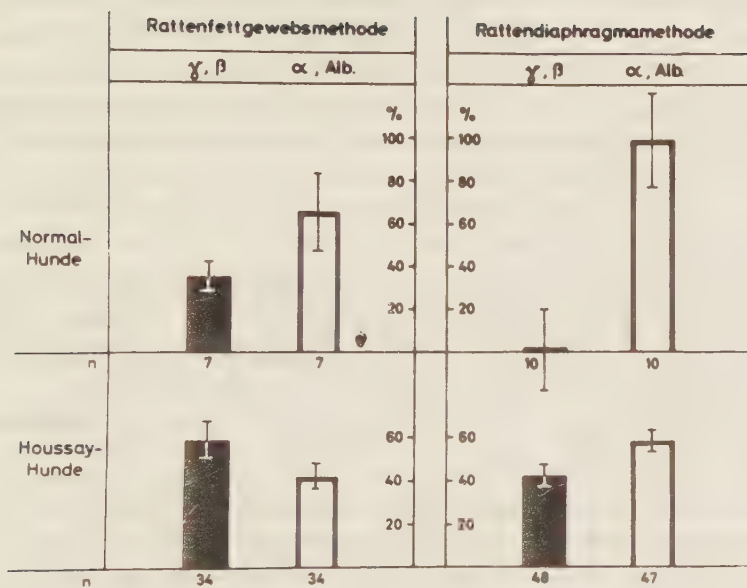


Abb. 4 Prozentuale Verteilung der Insulinwirkung von zonen-
elektrophoretisch getrennten Serumproteinfractionen

Fraktion 2.4 ± 0.9 mg%/10 mg, in der α_2 -Globulin-Fraktion 8.9 ± 2.7 mg%/10 mg und in der α_1 -Globulin-Albumin-Fraktion 6.5 ± 0.9 mg%/10 mg (Tab. 13).

Nach der Hypophysektomie liegen die Werte aus den gepoolten Seren von 2 Hunden - in der gleichen Reihenfolge angegeben - bei 4.9 ± 0.6 mg%/10 mg, 4.7 ± 0.8 mg%/10 mg, 1.7 ± 0.9 mg%/10 mg und 0.4 ± 0.4 mg%/10 mg (Tab. 14).

Bei 6 Houssay-Hunden lauten die Werte für die einzelnen Fraktionen 3.8 ± 1.2 mg%/10 mg, 10.7 ± 1.1 mg%/10 mg, 12.2 ± 0.5 mg%/10 mg und 8.2 ± 0.9 mg%/10 mg (Tab. 15).

b. Prozentuale Verteilung

Prozentual berechnet verteilt sich die Insulinwirkung bei Versuchsbeginn auf die "gebundene" Insulinform mit 1 ± 20 % (γ -Globulin-Fraktion - 13 ± 17 %, β -Globulin-Fraktion 15 ± 6 %) und auf die "freie" Form mit 99 ± 22 % (α_2 -Globulin-Fraktion 57 ± 17 %, α_1 -Globulin-Albumin-Fraktion 41 ± 6 %) (Abb. 4, Tab. 13).

Die Werte nach der Hypophysektomie berechtigen uns wegen der geringen Anzahl der möglichen Untersuchungen nicht zu einer sicheren Aussage. Leider standen für die Durchführung der Untersuchungen keine ausreichenden Serummengen mehr zur Verfügung, und es konnten nur 6 Bestimmungen für jede Fraktion ausgeführt werden. Sie ergaben mit 103 ± 9 % ("gebunden") und -3 ± 9 % ("frei") Werte, die im Gegensatz zu den Resultaten bei der Messung mit der Fettmethode stehen. Das Verhältnis hatte sich total umgekehrt (Tab. 14).

Im Vergleich zu den Normalhunden ist bei den Houssay-Hunden der "gebundene" Anteil der Insulinwirkung (γ -Globulin-Fraktion 11 ± 3 %, β -Globulin-Fraktion 31 ± 3 %) auf 42 ± 5 % gestiegen, der "freie" Anteil (α_2 -Globulin-Fraktion 35 ± 1 %, α_1 -Globulin-Albumin-Fraktion 23 ± 3 %) auf 58 ± 5 % gefallen (Abb. 4, Tab. 15).

VII. Diskussion

Die vorliegenden Beobachtungen bestätigen zunächst einmal die klassischen Erfahrungen von Houssay u.M. (1930 a, 1931 b), dass die neben der Pankreatektomie beim gleichen Tier durchgeführte Hypophysektomie die Schwere des Diabetes bessert und das Leben der Versuchstiere verlängert. Während in den Versuchen von Houssay und Biasotti (1931 b) pankreatektomierte Hunde ohne Insulinbehandlung nur 10 - 12 Tage am Leben erhalten werden konnten, überlebten die sowohl pankreatektomierten als auch hypophysektomierten Tiere dieser Autorenen ohne Insulin 25 - 90 Tage bzw. mit kurzfristiger Insulinbehandlung sogar 154 und 180 Tage. Eine gleich lange Versuchsdauer konnte bei unseren Untersuchungen nicht erreicht werden. Unsere lediglich pankreatektomierten Hunde überlebten die Operation zwar ebenso lang wie die Tiere von Houssay und Biasotti (1931 b) und vieler anderer Arbeitsgruppen (Groen u.M., 1952; Vallance-Owen und Lukens, 1957; Leonards, 1959; Takeuchi u.M., 1960; Sheps u.M., 1960; Goldberg und Egdahl, 1961; Slater u.M., 1961; Egdahl und Goldberg, 1962; Leonards u.M., 1962; Steinke u.M., 1962; Samaan u.M., 1963). Unsere Houssay-Hunde konnten jedoch nur bis höchstens zum 35. Tag nach der zweiten Operation am Leben erhalten werden. Die von uns erreichte Versuchsdauer liegt damit zwar unter der von Houssay u.M. (1931 b), ist aber grösser als die von Vallance-Owen und Lukens (1957) sowie Steinke u.M. (1962) bei Katzen.

Die Differenz zwischen diesen älteren und jüngeren Ergebnissen ist nur schwer zu erklären. Bei den Untersuchungen aus der letzten Zeit wurde nach dem Tod der Versuchstiere eine Autopsie vorgenommen und die Vollständigkeit der Operationen gesichert. Möglicherweise sind bei Houssay und Biasotti (1931 b) kleinste Drüsenreste zurückgeblieben, und wahrscheinlich wurde noch nicht das Vorhandensein von Pankreasektopien ausgeschlossen, die mit einer geringen Insulinproduktion für eine längere Überlebenszeit verantwortlich sein könnten. Das Vorhandensein derartiger Ektopien wurde in den letzten Jahren immer wieder beobachtet und unseres Wissens zuletzt in einer Studie von Sirek u.M. (1960) eingehend diskutiert.

Die Untersuchungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die sich mit dem Einfluss von Hypophysektomie und Pankreatektomie auf die Serum-Insulinwirkung bei Tieren beschäftigt haben, sind in Abb. 5 zusammengestellt und mit unseren Ergebnissen verglichen worden. Auf der Abbildung ist jede Arbeitsgruppe mit einem Buchstaben belegt, auf den im folgenden bei den Zitate Bezug genommen wird.

Unsere Beobachtung, dass die mit der Fettgewebsmethode gemessene Serum-Insulinwirkung nach Hypophysektomie und Pankreatektomie nur auf etwa die Hälfte des Normalwertes abfällt und nicht vollständig aus dem Blut verschwindet, steht im Einklang mit den Ergebnissen zahlreicher anderer Autoren. So fanden auch Ball und Knobil (a) nach Hypophysektomie im unverdünnten Serum von Affen nur einen Abfall der Serum-Insulinwirkung um etwa die Hälfte. Diese Untersucher führten jedoch nach der Hypophysektomie keine Pankreatektomie durch.

Auch bei pankreaslosen Tieren verschwindet überraschenderweise die mit der Fettgewebsmethode messbare Serum-Insulinwirkung nicht aus dem Blut. So konnten Leonards (g), Egdahl und Goldberg (d), Goldberg und Egdahl (e), Leonards u.M. (h), Samaan u.M. (l), Saure (m), Sheps u.M. (n), Steinke u.M. (p), und Slater u.M. (o) beobachten, dass die Insulinaktivität im Hundeserum nach Pankreatektomie zwar abfällt, aber selten weniger als 50% des Normalwertes beträgt. Bei einigen Tieren von Egdahl und Goldberg (d), Goldberg und Egdahl (e), Leonards (g), Leonards u.M. (h) und Sheps u.M. (m) trat erstaunlicherweise während der für die Untersuchungen zur Verfügung stehenden Zeit überhaupt keine Veränderung ein.

Auch bei einer längeren Versuchsdauer, wie sie Steinke u.M. (p) mit 8 und Samaan u.M. (l) mit 34 Tagen gelegentlich erreichten, betrug die Serum-Insulinwirkung immer noch die Hälfte bzw. ein Drittel des Ausgangswertes. Die lange Überlebenszeit, die Samaan u.M. (l) für einen nur pankreatektomierten, nicht mit exogenem Insulin behandelten und später auch nicht hypophysektomierten Hund mitteilen, steht jedoch im Gegensatz zu sämtlichen anderen Untersuchungen und kann unseres Erachtens nur mit einer unvollständig durchgeführten Pankreatektomie erklärt werden.

Auch bei pankreaslosen, hypophysektomierten Katzen konnte kein

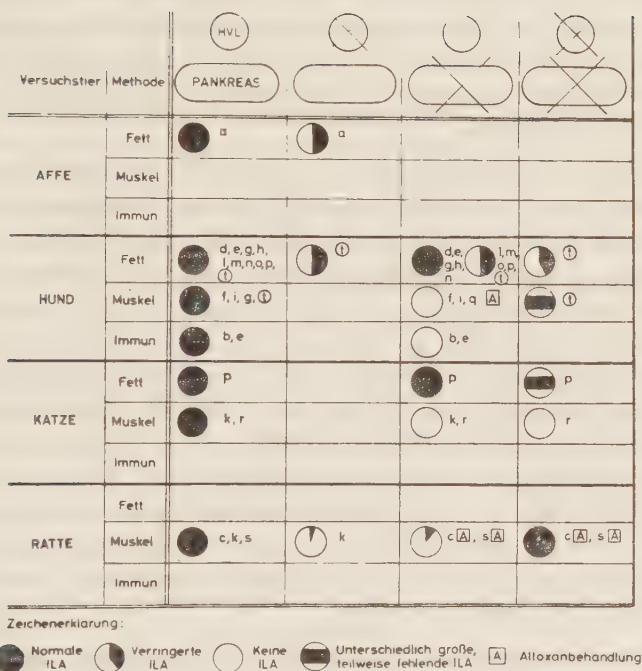


Abb. 5 Schematische Übersicht über die Serum-Insulinwirkung bei hypophysectomierten, pankreatektomierten und Houssay-Tieren

Untersucher:

- a) Ball u.M., 1963; b) Berson, 1962;
 c) Bornstein u.M., 1955; d) Eg Dahl u.M., 1962;
 e) Goldberg u.M., 1961; f) Groen u.M., 1952;
 g) Leonards, 1959; h) Leonards u.M., 1962;
 i) Okumura, 1960; k) Randle u.M., 1956;
 l) Samaan u.M., 1963; m) Saure, 1963;
 n) Sheps u.M., 1960; o) Slater u.M., 1961;
 p) Steinke u.M., 1962; q) Takeuchi u.M., 1957;
 r) Vallance-Owen u.M., 1957; s) Whitney u.M., 1957;
 t) Eigene Untersuchungen

Verschwinden der Serum-Insulinwirkung festgestellt werden (Steinke u.M., p). Lediglich einmal (Samaan u.M., 1) war die Insulinwirkung bei einem pankreatektomierten und einem pankreaslosen, zusätzlich mit Alloxan behandelten Hund nach ungefähr 20 Tagen fast völlig aus dem Blut verschwunden. Samaan u.M. (1) nehmen nur bei diesen beiden Tieren, die aus einer Serie von 5 Hunden stammen, an, dass die insulinproduzierenden Pankreasinseln (operativ oder durch Alloxanbehandlung) total entfernt wurden.

Die von uns bei Houssay-Hunden mit der Fettgewebismethode gefundenen Ergebnisse stehen mit den mit diesem Verfahren bisher mitgeteilten Resultaten weitgehend in Übereinstimmung. Nach der zuerst vorgenommenen Hypophysektomie fiel die in Normalseren gemessene Insulinwirkung von 420 ± 69 auf 180 ± 36 bzw. 240 ± 42 $\mu\text{E/ml}$ signifikant ab. (Abb. 2, Tab. 5). In den 5 Wochen nach der Zweitoperation sank die mittlere Serum-Insulinwirkung zwar ab (Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte nach der ersten Woche 166 ± 37 $\mu\text{E/ml}$, nach der zweiten Woche 209 ± 38 $\mu\text{E/ml}$, nach der dritten Woche 155 ± 18 $\mu\text{E/ml}$, nach der vierten Woche 112 ± 21 $\mu\text{E/ml}$ und nach der fünften Woche 140 ± 25 $\mu\text{E/ml}$); die Differenz gegenüber den Werten aus der Zeit zwischen Hypophysektomie und Pankreatektomie lässt sich aber statistisch nicht sichern.

Die mit der Fettgewebismethode messbare Serum-Insulinwirkung verschwindet also auch lange Zeit nach Entfernung des Pankreas nicht aus dem Blut. Selbst 5 Wochen nach der Pankreatektomie - nur 2 Hunde erreichten diese lange Versuchsdauer - liess sich immer noch ein Drittel der normalen Serum-Insulinwirkung nachweisen.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen der eigenen Untersuchungen sowie den Resultaten anderer Autoren steht das mit Hilfe der Rattenzwerchfellmethode immer wieder beobachtete totale Verschwinden der Serum-Insulinwirkung aus dem Blut nach der Pankreatektomie. So war eine durch das Serum von normalen Tieren gesteigerte Glucoseaufnahme des Diaphragma unter dem Einfluss des Serums von pankreatektomierten oder alloxanbehandelten Hunden bei Groen u.M. (f), Okumura (i) und Takeuchi u.M. (q) nicht mehr festzustellen. Dasselbe Ergebnis teilten Vallance-

Owen und Lukens (r) von 9 pankreatektomierten Katzen mit. Auch das Serum von 3 Houssay-Katzen war nicht in der Lage, eine Steigerung der basalen Glukoseaufnahme herbeizuführen (Vallance-Owen und Lukens (r)). Nur bei alloxandiabetischen, hypophysektomierten Ratten lag die Netto-Glukoseaufnahme in der gleichen Höhe wie bei normalen Tieren (Bornstein und Park, c; Whitney und Young, s).

Dieses Verschwinden des Diaphragma-Insulineffektes aus dem Blut von pankreaslosen Hunden und Katzen konnten wir nur bei einem Teil unserer Tiere bestätigen. Während die Normalseren unserer Hunde zu einer einheitlichen und signifikanten Steigerung der Netto-Glukoseaufnahme führten und damit auch den Werten von Vallance-Owen und Lukens(r) entsprechen, war das Verhalten des Serums von 6 Hunden, die nach 1-5 wöchiger Versuchsdauer ohne Pankreas entblutet wurden, sehr unterschiedlich. Das Serum von 3 Hunden nach ein-, zwei- und auch fünfwöchiger Überlebenszeit rief eine signifikant über der Basalaufnahme des Diaphragma liegende Steigerung der Glukoseaufnahme hervor. Dagegen war das Serum der anderen 3 nach 3, 4 und 5 Wochen getöteten Hunden nicht in der Lage, die basale Glukoseaufnahme signifikant zu steigern.

Mit der immunologischen Methode wurde unseres Wissens bisher nur einmal das Blut von pankreaslosen Tieren untersucht. Berson (b) fand in den Seren "einiger ausgewählter" Hunde, die von Goldberg und Egdahl (e) operiert worden waren, keine Insulinwirkung (genaue Zahlenangaben fehlen sowohl in der Arbeit der Operateure als auch der des Untersuchers). Angaben über die immunologische Serum-Insulinwirkung dieser Hunde vor der Operation wurden nicht mitgeteilt.

Vergleichswerte für die von uns gemessenen Normalwerte sind bisher nur von Melani u.M. (1963 b) angegeben worden, nach deren Versuchsanordnung auch unsere Untersuchungen durchgeführt wurden. Die von Melani u.M. (1963 b) und uns beobachteten Ergebnisse stimmen überein und sind auch mit denen von Yalow und Berson (1960 b) bei stoffwechselgesunden Menschen gefundenen Werten vergleichbar.

In unseren Untersuchungen lag jedoch die mit diesem Verfahren gemessene Serum-Insulinwirkung vor und nach Hypophysenektomie und Pankreatektomie annähernd im gleichen Grössenordnungsbereich.

Der somit fehlende Abfall der immunologischen Serum-Insulinwirkung bei Houssay-Hunden ist nach unserer Ansicht nur dadurch zu erklären, dass der Insulingehalt der Seren unserer Normal- und Houssay-Hunde im unteren Bereich der Empfindlichkeit unserer bisher benutzten Versuchsanordnung lag. Bei noch stärkerer Verdünnung des Insulin-Antiserums und des Jod-¹³¹-markierten Insulins könnten möglicherweise Insulinkonzentrationen bis unter 1 $\mu\text{E/ml}$ bestimmt werden, was bei der zur Trennung des freien und gebundenen Insulins mit dem Harzionsaustauscher erforderlichen Serumverdünnung von 1:10 umgerechnet jedoch immer noch Werten von 10 $\mu\text{E/ml}$ entspricht. Die Umstellung des Verfahrens ist zur Zeit im Gange; die Resultate werden in einer späteren Arbeit, in der auch über Belastungen mit Glukose, Wachstumshormon, Glukagon und Tolbutamid bei Houssay-Hunden berichtet werden wird, mitgeteilt.

Nachdem wir festgestellt hätten, dass die mit der Fettgewebemethode messbare Insulinwirkung teilweise auch noch Wochen nach der Pankreatektomie nachweisbar ist, und nachdem auch mit der Zwerchfellmethode bei der Hälfte der Tiere eine Insulinwirkung nachweisbar war, erschien es notwendig, festzustellen, ob dieses Insulin auch in einer wirksamen Form vorliegt. Hierzu stand nun die zonenelektrophoretische Fraktionierung der Serumproben zur Verfügung. Mit diesem Verfahren ist es nach den Untersuchungen von Ditschuneit u.M. (1962) ähnlich wie nach Antoniades u.M. (1958), die zur Trennung einen Ionenaustauscher benutzten, möglich, die Gesamt-Insulinwirkung in eine "freie" und in eine "gebundene" Form zu unterteilen. Die zitierten Untersuchungen hatten gezeigt bzw. Anhaltspunkte dafür erbracht, dass das sog. "gebundene" Insulin an ein stark basisches Protein gekoppelt ist und in der gamma- und beta-Globulin-Fraktion wandert, während sich das "freie" Insulin nach der Trennung im alpha-Globulin-Albumin-Bereich befindet.

Die Trennung wird in Krebs-Ringer-Pufferlösung bei pH 7.8 - 8.0 und mit Hilfe eines Polyvinylchloridpulvers ausgeführt. Bei dieser Wasserstoffionenkonzentration bleibt die immunologische Affinität des Insulins voll erhalten, auch wird dadurch die für die Bestimmung der Insulinwirkung der einzelnen Proteinfraktionen bei Verwehdung anderer Puffer erforderliche und sich möglicherweise nachteilig auswirkende mehrstündige Dialyse überflüssig.

Die Arbeitsgruppe von Antoniades (1958; 1961 a,b; 1962 a,b) konnte weiterhin experimentelle Anhaltspunkte dafür vorlegen, dass in vitro die "gebundene" Form des Insulins am Festgewebe wirksam ist, nicht aber am Rattendiaphragma. Sie vermuteten aufgrund dieser Beobachtung, dass die "gebundene" Form immunologisch weitgehend inaktiv wäre und den Blutzucker nicht zu senken vermöge. Diese Schlussfolgerungen werden durch die Untersuchungen von Ditschuneit u.M. (1962) bestätigt.

Unsere Untersuchungen mit diesem Verfahren führten zu folgenden Ergebnissen: Im Blut von 3 Normalhunden fanden wir mit der Fettgewebsmethode $65 \pm 17\%$ der Insulinwirkung im "freien" Bereich, während $35 \pm 7\%$ im "gebundenen" Bereich lagen (Abb.4, Tab.10). Bei Verwendung des Zwerchfellverfahrens waren dagegen $99 \pm 22\%$ mit den alpha-Globulinen und Albuminen gewandert, während die gamma- und beta-Globuline mit $1 \pm 20\%$ praktisch keine Insulinaktivität aufwiesen (Abb.5, Tab.13).

Unseres Wissens wurden ähnliche Untersuchungen bei Tieren mit dem Zwerchfellverfahren noch nicht durchgeführt, sodass Vergleiche nicht möglich sind. Steinke u.M. (1962) hatten mit der Fettgewebstechnik dagegen schon schon getrennte Seren untersucht. Sie verwendeten allerdings die Säulenchromatographie zur Trennung der Serumproteine und fanden im Gegensatz zu uns den grösseren Anteil im "gebundenen" Bereich, ein Ergebnis, das auch von Ditschuneit u.M. (1962), Antoniades (1962) und Antoniades u.M. (1961 a, 1962 b) beim Menschen gefunden wurde.

Da uns infolge Materialmangels nicht beide Trennverfahren schon in dieser Arbeit zur Anwendung bringen konnten, ist es notwendig, vor einer abschliessenden Stellungnahme weitere Untersuchungen durchzuführen. Sie wurden vor kurzer Zeit in Angriff genommen.

Im Serum von 2 Hunden kam es nach der Hypophysektomie bei Verwendung der Fettgewebsmethode zu keiner weiteren Verschiebung ("freies" Insulin $64 \pm 12\%$, "gebundenes" Insulin $36 \pm 6\%$, Tab. 11). Bei Untersuchung mit der Zwerchfelltechnik kam es dagegen zu einer totalen Umkehr, und es war im gepoolten Serum von 2 Houssay-Hunden praktisch nur noch "gebundenes" Insulin nachweisbar (Tab.14). Wir möchten auch dieses Einzelergebnis noch nicht beurteilen, sondern zunächst einmal mit weiteren Untersuchungen kontrollieren.

Eine nach unserer Ansicht ausreichende Zahl von Untersuchungen war dagegen bei unseren Houssay-Hunden möglich. Hier stand uns das Blut von 6 Hunden zur Verfügung, und wir konnten für jede Fraktion 34 Einzelbestimmungen mit dem Fettgewebsverfahren und 46 Tests mit der Zwerchfellmethode ausführen. Dabei ergab sich, dass nach der Entfernung beider Drüsen die beiden Insulinformen im Fettgewebsverfahren im annähernd umgekehrten Verhältnis vorlagen wie vor den Operationen. Der "freie" Anteil hatte sich von 65 ± 17 auf $42 \pm 6\%$ vermindert, während der "gebundene" Anteil von 35 ± 7 auf $58 \pm 8\%$ anstieg (Abb.4, Tab.10 und 12). Auch mit der Zwerchfellmethode war jetzt eine deutliche und immer wieder reproduzierbare "gebundene" Fraktion zu finden. Die mit dieser Technik ermittelten Werte betrugen $58 \pm 5\%$ für die "freie" und $42 \pm 5\%$ für die "gebundene" Fraktion (Abb.4, Tab.15).

Auch in den Untersuchungen von Steinke u.M.(1962) zeigte sich das gleiche Phänomen, d.h. die Verschiebung zur "gebundenen" Seite hin nach der Pankreatektomie. Im gleichen Sinne lassen sich auch die Resultate von Samaan u.M. (1963) interpretieren, die nach der Pankreatektomie den grösseren Anteil als sog. "atypisches" Insulin fanden, d.h. als ein Insulin, das mit dem "gebundenen" Insulin vergleichbar scheint.

Eigene vorläufige Untersuchungen nach Zusatz von Anti-Insulin bestätigen das Resultat von Samaan u.M.(1963), konnten aber mit dem vorhandenen Material aus dieser Versuchsreihe nicht zu Ende geführt werden.

VIII. Schlussbetrachtung

Die differenten Ergebnisse, die bei der Untersuchung der gleichen Serumproben mit den verschiedenen Insulinbestimmungsmethoden gefunden wurden, zeigen zunächst einmal deutlich, dass sämtliche in vitro-Methoden nicht den absoluten Insulingehalt des Blutes messen können, sondern dass sie nur die in dem jeweiligen Verfahren effektive Insulinkonzentration erfassen. Viele Faktoren beeinflussen die verschiedenen Bestimmungen; sie sind in jeder Methode in differentem Ausmass wirksam. Die im Plasma oder Serum gemessene Insulinwirkung muss daher als die Summe des Effektes von Insulin sowie aller Insulin-Synergisten und -Antagonisten angesehen werden. Die letzteren können ihre Wirkung dabei sowohl über einen Effekt auf den Stoffwechsel des zur Bestimmung benutzten Gewebes als auch über eine Hemmung der Insulinwirkung im Serum geltend machen bzw. auf beiden Wegen in den Test eingreifen. Zahlreiche Insulin-Antagonisten sind bisher im Blut von normalen und Stoffwechselgestörten Menschen und Versuchstieren gefunden worden (Bornstein, 1953; Bornstein und Park, 1953; Randle und Young, 1956; Vallance-Owen, 1960 a, 1963; Vallance-Owen u.M., 1957; 1958 a,b; 1961, a,b; Whitney und Young, 1957; Lowy u.M., 1961; Lyngsoe, 1962). Ihre Wirkung kann jedoch nur mit Hilfe des Diaphragma nachgewiesen werden, am Fettgewebe sind sie unwirksam und beeinflussen die Bestimmung der Insulinaktivitäten nicht (Lowy u.M., 1961; Lyngsoe, 1962). Auch sind die bei einem Versuchstier gefundenen Antagonisten nicht unbedingt bei einer anderen Tierart nachzuweisen. Schliesslich weisen die bisher vorliegenden Resultate darauf hin, dass diese Insulin-Antagonisten nur im Serum von Versuchstieren mit intakter Hypophyse und Nebennierenrinde zu finden sind.

Während die "Insulin"-Bestimmung am Rattenzwerchfell durch die Insulin-Antagonisten stark beeinflusst und "verfälscht" werden kann, nehmen möglicherweise ganz andere Faktoren Einfluss auf die mit dem Rattenfettgewebe zu messende Serum-Insulinwirkung. Antoniades (1961, 1962) sowie Antoniades u.M. (1961 a, b; 1962 a,b) haben, wie schon diskutiert, zwei Trans-

portformen des Insulins im Blut nachweisen können. Die "freie" Form ist in vivo aktiv und lässt sich mit allen Insulinbestimmungsmethoden nachweisen, die in vivo inaktive, an ein basisches Serumprotein "gebundene" Form dagegen ist in vitro nur am Fettgewebe wirksam. Die Bindung an das Protein ist, das kann aus den bisher vorgelegten Resultaten geschlossen werden, relativ locker und kann wahrscheinlich auch in vivo gelöst werden.

Aufgrund der angewandten, oben ausführlich dargelegten Technik ist es wahrscheinlich, dass das immunologische Verfahren den absoluten Insulingehalt oder zumindest doch einen an Exaktheit den biologischen Techniken überlegenen Wert feststellt. Man kann aber mit dieser Methode nicht die Insulinmoleküle erfassen, die an der Bindung mit dem Insulinantikörper durch andere Insulin-bindende Faktoren gehemmt werden (Yalow und Bersch, 1961a).

Obwohl also mit sämtlichen Methoden lediglich die effektive Wirkung im Blut und wahrscheinlich nur in grober Annäherung der absolute Insulingehalt bestimmt werden kann, dürfen die angewandten Verfahren als relativ spezifisch angesehen werden. Mehrere Kriterien geben zuverlässige Hinweise für die Spezifität der einzelnen Methoden und berechtigen uns, von einer Insulinaktivitätsmessung zu sprechen. Von Martin u.M. (1958), Renold und Steinke (1962) sowie von Ditschuneit (1964) wurden Anhaltspunkte für und gegen die Spezifität der Insulinbestimmung mit dem isolierten epididymalen Rattenfettgewebe zusammengestellt, die von zahlreichen anderen Autoren bestätigt wurden.

Für die Spezifität der Rattenfettgewebsmethode spricht danach:

1. Die Serum-Insulinwirkung (SIW) steigt bei vermehrter Insulinsekretion aus dem Pankreas nach Stimulation durch Glukose und Sulfonylharnstoffe an (Pfeiffer u.M., 1957, 1958; Martin u.M., 1958; Sheps u.M., 1960; Müller-Ruchholtz u.M., 1962; Ditschuneit u.M., 1961, 1963).

2. Die SIW steigt innerhalb von 10 Minuten nach intravenöser Gabe von kristallinem Insulin an (Martin u.M., 1958; Ditschuneit u.M., 1961, 1963).
3. Die mittlere SIW ist bei Kranken mit Inselzelladenomen erhöht und fällt nach operativer Entfernung des Tumors auf Normalwerte ab (Ditschuneit u.M., 1961; Pfeiffer u.M. 1959; Renold u.M., 1960, 1962).
4. Die SIW ist in der Pankreasvene wesentlich höher als im peripheren Blut (Pfeiffer u.M., 1958, 1959, 1961; Renold u.M., 1960; Müller-Ruchholtz u.M., 1962; Samaan u.M., 1963).
5. Die SIW lässt sich ebenso wie der Effekt von kristallinem Insulin durch Cystein und Glutathion hemmen (Martin u.M., 1958; Leonards, 1959; Renold u.M., 1960; Steinke u.M., 1962; Samaan u.M., 1963).
6. Die SIW sinkt bei Verdünnung normaler Serumproben proportional zu der Verdünnung ab (Renold u.M., 1960; Sheps u.M., 1960; Ditschuneit u.M., 1964).

Gegen eine absolute Spezifität der Rattenfettgewebsmethode lässt sich anführen:

1. Die SIW verschwindet nach Pankreatektomie nicht vollständig aus dem Blut (Egdahl und Goldberg, 1962; Goldberg und Egdahl, 1961; Leonards, 1959; Sheps, u.M., 1960; Slater u.M., 1961; Leonards u.M., 1962; Steinke u.M., 1962; Samaan u.M., 1963; Saure, 1963).
 2. Die SIW kann durch Insulin-Antikörper in vitro kaum gehemmt werden (Leonards, 1959; Sheps u.M., 1960; Ramseier u.M., 1961; Steinke u.M., 1962; Froesch , 1962; Samaan u.M., 1963).
- Renold und Steinke (1962) haben daher in ihrer jüngsten Übersicht geschlossen, dass der grösste Teil der mit der Fettgewebsmethode gemessenen Serum-Insulinwirkung "von der Aktivität einer Substanz (oder von Substanzen) stammt, die dem Insulin sehr ähnlich sind". Die Störung durch andere Faktoren ist beim Fettgewebsverfahren bisher nicht auszuschliessen. Die Natur dieser möglicherweise aus anderen Faktoren stammenden "insulin-like activity" muss allerdings noch geklärt werden.

Ähnliche Kriterien wurden inzwischen auch für und gegen die Spezifität der Bestimmung am isolierten Rattendiaphragma erarbeitet. Vallance-Owen (1960 b) hat diese Anhaltspunkte zusammengestellt.

Für die Spezifität der Diaphragmamethode sprechen:

1. Die Netto-Glukoseaufnahme (GA) verschwindet nach Pankreatektomie bei Hunden und Katzen fast vollständig (Groen u.M., 1952; Vallance-Owen und Hurlock, 1954; Vallance-Owen und Lukens, 1957; Takeuchi u.M., 1957; Okumura, 1960).
2. Die GA ist in Standardinsulinlösungen je nach der vorhandenen Insulinmenge erhöht und lässt sich durch Zugabe von Cystein und Glutathion hemmen (Groen u.M., 1952; Randle, 1954; Vallance-Owen und Hurlock, 1954; Vallance-Owen und Wright, 1960).
3. Die GA steigt im Serum 20 Minuten nach intravenöser Insulingabe an (Vallance-Owen und Hurlock, 1954).
4. Die GA ist bei Kranken mit Inselzelladenomen erhöht und sinkt nach der Tumorentfernung auf Normalwerte ab (Groen u.M., 1952; Vallance-Owen, 1960 b).
5. Die GA von Standard-Rinderinsulinlösungen verschwindet nach Zugabe von Meerschweinchen-Anti-Rinderinsulin (Vallance-Owen, 1960 b).

Gegen die Spezifität der Diaphragmamethode lässt sich anführen:

1. Die normale GA wird durch Antagonisten im Serum sehr stark gehemmt (Randle, 1954; Takeuchi u.M., 1957; Willebrands u.M., 1958).
2. Bei Verdünnung der Serumproben steigt die GA an - sog. Verdünnungseffekt der Antagonisten (Randle, 1954; Takeuchi u.M., 1957; Willebrands u.M., 1958).

Auch diese Methode misst damit nicht spezifisch den Insulin-gehalt des Blutes, sondern sie erfasst nur die Summe der Effekte aller Faktoren mit insulinsynergistischer und -antagonistischer Wirkung. Die Differenz zu den Messungen mit Hilfe des Rattenfettgewebes, die eine viel höhere Serum-Insulinwirkung ergeben, sind durch den Einfluss der Insulin-Antagonisten auf der einen Seite und die Proteinbindung des Insulins

(Antoniades, 1961, 1962; Antoniades u.M., 1958; 1961 a,b; 1962 a,b) auf der anderen Seite zu erklären.

Für die Spezifität der immunologischen Methode sprechen auch alle oben zitierten, von Vallance-Owen (1960 b) für die Diaphragmamethode zusammengestellten Punkte, die von Yalow und Berson (1959; 1960 a,b; 1961) in zahlreichen Untersuchungen erarbeitet wurden.

Für die Spezifität der immunologischen Methode sind folgende Kriterien zu nennen:

1. Die Serum-Insulinwirkung (SIW) fällt proportional mit steigender Verdünnung der Serumprobe. Antagonisten hemmen die Reaktion zwischen Insulin und I_n Insulin-Antikörpern nicht.
2. Die SIW steigt nach intravenöser Injektion von kristallinem Insulin.
3. Die SIW wird ebenso wie die Wirkung von kristallinem Insulin durch Cystein gehemmt.
4. Die SIW ist bei Kranken mit Adenomen erhöht und fällt nach der Tumorentfernung auf Normalwerte ab.
5. Die SIW ist nach oraler Gabe von Glukose und nach Zufuhr von Sulfonylharnstoffen erhöht.

Aber auch gegen die Spezifität der immunologischen Methode lassen sich drei Gesichtspunkte anführen:

1. Das Jod-131-markierte Insulin kann durch Bindung an endogene Insulin-Antikörper an der Reaktion mit dem zugesetzten Test-Antikörper gehindert werden.
2. Endogenes Insulin kann ebenfalls durch Bindung an endogene Insulin-Antikörper dem Bestimmungsversuch entzogen werden.
3. Speziesunterschiede zwischen Standard- und Test-Insulin stören die Bestimmung.

Bei dem Vergleich der drei Methoden muss also betont werden, dass alle drei Methoden nicht den absoluten Insulingehalt des Serums messen. Die Wirkung der vorhandenen Insulinmenge wird bei der Messung in vitro (und wahrscheinlich auch in vivo) durch die bei den einzelnen Methoden z.T. unterschiedlichen, teils fördernden, teils hemmenden Faktoren beeinflusst. Der Vergleich der mit den verschiedenen Methoden gewonnenen Er-

gebnisse ist also nur unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse möglich.

Unsere Untersuchungen mit den verschiedenen Methoden haben eine Reihe von Ergebnissen anderer Autoren, die ebenfalls den Einfluss der Pankreasentfernung auf den Seruminsulinspiegel untersucht haben, bestätigt (Abb. 5). Nach der Entfernung von Hypophyse und Pankreas verschwindet die Serum-Insulinwirkung in unseren Untersuchungen nicht vollständig aus dem Blut. Da die Stoffwechsellage der operierten Tiere auf einen in jedem Falle verminderten, teilweise sogar auf einen fehlenden aktiven Insulingehalt hinweist, kann die mit der Fettgewebsmethode nachgewiesene, im Organismus verbleibende Serum-Insulinwirkung nur auf eine Insulinform zurückgeführt werden, die für das Gewebe des lebenden Tieres unwirksam ist, am Fettgewebe in vitro aber einen insulinähnlichen Effekt entfaltet (Steinke u.M., 1962). Die Wirksamkeit am Diaphragma dagegen lässt sich nicht eindeutig sichern. Möglicherweise ist die in vivo inaktive, mit dem Fettgewebsverfahren nachgewiesene Form des Insulins eine an Proteine "gebundene" Insulinform, die nur langsam im Verlaufe von Wochen metabolisiert wird (Steinke u.M., 1962). Nur ein Teil dieser Serum-Insulinwirkung kann nach den Untersuchungen von Steinke u.M. (1962) und nach den vorliegenden Resultaten durch Salzsäure-Alkohol extrahiert und durch Antiserum gehemmt werden. Die Natur des restlichen Teiles ist vorläufig ungeklärt.

IX. Zusammenfassung

In den letzten 12 Jahren wurde das Problem der Insulinwirkung des Blutes pankreasloser Tiere an verschiedenen Stellen bearbeitet. Die vorliegenden Resultate waren überraschend und teilweise auch widersprechend; der Vergleich der Ergebnisse ist durch unterschiedliche Methodik und Versuchsanordnung erschwert. In Anbetracht dieser Situation wurden in der vorliegenden Arbeit mit 3 unterschiedlichen Methoden die Insulinaktivitäten in den Seren einer Tierart bestimmt.

Zur Untersuchung kamen 3 Hunde, die nur pankreatektomiert wurden, sowie 12 Hunde, die zunächst hypophysektomiert und 2 - 3 Wochen später pankreatektomiert wurden. Bei diesen Houssay-Tieren war es möglich, den Einfluss der Pankreatektomie auf die Serum-Insulinwirkung bis zu 5 Wochen nach der Operation zu verfolgen. Die Insulinaktivitäten wurden mit Hilfe des isolierten epididymalen Rattenfettgewebes, des isolierten Rattendiaaphragma und Insulin-bindender Antikörper bestimmt.

Die Untersuchungen führten zu folgenden Resultaten:

1. Die Blutzucker-Normalwerte liegen bei 72 ± 7 bzw. 65 ± 3 mg%. Nach der Hypophysektomie sinkt der Blutzuckerspiegel auf 51 ± 5 bis 55 ± 4 mg%. Er steigt nach der Pankreatektomie auf 235 ± 49 mg% bzw. 187 ± 25 bis 289 ± 71 mg% an.
2. Bei den 3 pankreatektomierten Hunden sinkt die im 1:2 verdünnten Serum mit dem Rattenfettgewebe gemessene Insulinwirkung von 255 ± 84 μ U/ml vor der Operation auf 103 ± 76 μ U/ml.
3. Die mit der Fettgewebsmethode bei den 12 Hunden im Normalzustand messbare Insulinaktivität von 410 ± 69 μ U/ml fällt nach der Entfernung der Hypophyse auf 188 ± 36 bzw. 240 ± 42 μ U/ml. Nach der darauffolgenden Pankreatektomie beträgt die Insulinwirkung in der 1. Woche 166 ± 37 μ U/ml, in der 2. Woche 209 ± 38 μ U/ml, in der 3. Woche 155 ± 18 μ U/ml, in der 4. Woche 112 ± 21 μ U/ml und in der 5. Woche 140 ± 25 μ U/ml. Die Werte nach den beiden Operationen liegen signifikant unter den Werten im Normalzustand; zwischen den Werten vor und nach der Pankreatektomie ist kein signifikanter Unterschied festzustellen.

4. Die Netto-Glukoseaufnahme des isolierten Rattendiaphragma beträgt bei der Untersuchung von 1:4 verdünnten Normalseren 4.4 ± 0.66 mg%/10 mg Trockengewicht, in einer Rinderinsulin-Standardlösung mit 1000 μ E/ml 5.31 ± 0.58 mg%/10 mg. Drei bis fünf Wochen nach Hypophysektomie und Pankreatektomie zeigen die Seren von 3 Hunden mit einer Netto-Glukoseaufnahme von 4.38 ± 1.14 , 2.44 ± 1.02 und 1.82 ± 0.81 mg%/10 mg eine signifikante Steigerung gegenüber der Basalaufnahme der Diaphragmata aus glukosehaltiger Pufferlösung. Die Seren von 3 weiteren Hunden mit einer Netto-Glukoseaufnahme von 1.17 ± 0.92 , 0.21 ± 0.79 und -0.96 ± 1.43 mg%/10 mg sind dagegen nicht in der Lage, die basale Glukoseaufnahme des Diaphragma signifikant zu steigern.

5. Die mit Hilfe Insulin-bindender Antikörper gefundenen Werte betragen bei der Verwendung des Agargels zur Trennung des "freien" und "Antikörper-gebundenen" Insulins im 1:2 verdünnten Serum bei Versuchsbeginn 20 ± 4.5 μ E/ml, nach der Hypophysektomie 14 ± 1.4 μ E/ml und nach der Pankreatektomie 22 ± 4.5 μ E/ml. Bei der Trennung mit Hilfe des Dowex-Harz-ionenaustauschers liegen die Werte im 1:5 verdünnten Serum vor den Operationen bei 4.2 ± 0.45 μ E/ml, nach der Hypophysektomie bei 4.5 ± 0.84 μ E/ml und nach der Pankreatektomie bei 5.1 ± 0.83 μ E/ml.

6. Ein Teil der Seren wurde zonenelektrophoretisch in die Serum-eiweissfraktionen getrennt. Die in den 4 Fraktionen gefundenen Insulinwirkungen verteilen sich folgendermassen: Bei Benutzung der Fettgewebismethode sind vor Versuchsbeginn 64% als sog. "freies" Insulin (in der α_1 -Globulin-Albuminfraktion und in der α_2 -Globulinfraktion) und 36% als sog. "gebundenes" Insulin (in der beta- und gamma-Globulinfraktion) nachzuweisen. Mit der Zwerchfellmethode finden sich dagegen 99% im "freien" und nur 1% im "gebundenen" Bereich. Nach Hypophysektomie und Pankreatektomie verteilen sich die Aktivitäten bei Untersuchung mit beiden Methoden annähernd gleichmässig auf den "freien" und "gebundenen" Bereich. Bei Benutzung der Fettgewebismethode sind 42% "freies" und 58% "gebundenes" Insulin, bei Benutzung der Zwerchfellmethode 58% "freies" und 42% "gebundenes" Insulin nachzuweisen.

Die Ergebnisse werden diskutiert und mit den Resultaten anderer Untersucher verglichen. Auf die Problematik "messbare Insulinaktivität:wahrer Insulingehalt" wird ausführlich eingegangen und abschliessend festgestellt, dass wahrscheinlich sämtliche Verfahren der Insulinaktivitätsbestimmung eine grössere "Serum-Insulinwirkung" erfassen als dem wahren Seruminsulingehalt entspricht.

X. Tabellen 1 - 15

(Die in den Tabellen 10-15 unter "Zusammen" angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte wurden jeweils aus der Summe aller Einzelwerte errechnet.)

Tabelle 1

Zusammenstellung der Untersuchungen an 15 Hunden

Hund	Geschlecht (m,f)	Gewicht (kg)	Zeit zwischen Hypophysektomie und Pankreat- ektomie (Tage)	Überlebenszeit nach der Pankreatektomie = Zeit ohne Pankreas (Tage)	Todesursache	Pathologischer Befund bei der Autopsie**)
Versuchsgruppe K: Pankreatektomierte Hunde						
K	m	12,0	-	14*)	Belastung der Zweitoperation	O.B.
KA	f	11,3	-	15*)	" "	O.B.
KB	f	12,0	-	5	Staube?	eitriges Peritonitis
Versuchsgruppe L: Hypophysektomierte und pankreatektomierte Hunde						
L	m	8,0	21	4	Kopftrauma nach Sprung aus dem Käfig	Gehirnblutung
LA	f	11,4	155	15	Auszeehrung	O.B.
LB	f	7,5	167	25	Auszeehrung	O.B.
LC	m	16,5	21	22	getötet	O.B.
LE	f	7,7	11	7	Staube?	eitriges Rhinitis
LG	m	11,0	14	20	getötet	O.B.
LH	f	14,5	15	33	getötet	O.B.
LI	m	13,0	12	6	Peritonitis	Peritonitis
IK	f	10,9	23	13	getötet	O.B.
IL	m	18,5	21	6	getötet	beginnende Nekrose der Duodenalschleife
IN	f	14,5	25	35	getötet	O.B.
IO	m	14,6	(1 Stunde)	20	Auszeehrung	O.B.

*) Die Hunde K und KA bekamen nach der Pankreatektomie Insulin (2E Alt- u. 4E Depot- Insulin).

**) In keinem Fall konnten Hypophysen- oder Pankreasreste gefunden werden.

Tabelle 2

Einfluß der Pankreatektomie auf den Blutzucker (mg%)
bei den 3 Hunden der Versuchsgruppe K

Hund	vor der Pankreatektomie	nach der Pankreatektomie
K*)	75	259
	85	116
KA*)	53	164
	-	402
KB	76	233
Mittelwert M	72	235**)
Standardabweichung des Mittelwertes σ_M	± 7	± 49

*) Die Hunde K und KA wurden nach der Pankreatektomie mit Insulin (2E Alt- u. 4E Depot-Insulin) behandelt.

**) Der Mittelwert nach der Pankreatektomie ist signifikant größer als der Mittelwert vor der Pankreatektomie.

Tabelle 7

Einfluß der Pankreatektomie auf die mit dem Rattenfett-
gewebe gemessene serum-(1:2)-Insulinwirkung ($\mu\text{E}/\text{ml}$) bei
288 - Stunden der Versuchsgruppe K

Hund	vor der Pankreatektomie	nach der Pankreatektomie
K*)	500	380
	230	50
	-	60
	-	220
KA*)	150	80
	-	30
	-	90
	-	40
KB	140	60
	-	20
Mittelwert M	255	103**)
Standardabweichung des Mittelwertes σ_M	± 84	± 76

*) Die Hunde K und KA wurden nach der Pankreatektomie mit Insulin (2E Alt- u. 4E Depot-Insulin/Tag) behandelt.

**) Der Mittelwert nach der Pankreatektomie ist nicht signifikant kleiner als der Mittelwert vor der Pankreatektomie.

Tabelle 4

Einfluß von Hypophysektomie und Pankreatektomie

auf den Blutzucker (mg%) bei den 12 Hunden der Versuchsgruppe I

Hund	Ausgangswert	Wochen nach Hypophysektomie		Wochen nach Hypophysektomie und Pankreatektomie				
		1	2	1	2	3	4	5
I	83	65	54	438	-	-	-	-
IA	66	59	48	-	-	-	-	-
IB	87	-	98	247	219	-	-	-
IC	75	-	-	284	198	-	-	-
ID	-	-	52	-	183	242	-	-
IE	63	59	58	310	230	230	-	-
IF	45	-	-	-	309	203	356	-
IG	66	-	51	351	-	-	-	-
IH	65	25	55	239	68	88	-	-
II	66	45	59	284	190	223	342	150
II	-	-	-	-	-	-	382	-
IK	-	-	34	247	-	-	-	-
IL	51	-	42	-	-	-	-	-
IM	59	59	46	260	169	-	-	-
IN	50	56	66	279	231	-	-	-
IO	71	-	-	222	-	-	-	-
IP	54	42	41	298	270	134	75	219
IQ	54	-	-	-	-	-	-	-
IR	80	-	-	256	314	-	-	420
IS	-	-	-	-	262	-	-	-

Mittelwert M 65 51 55 286*) 220*) 187*) 289*) 236*)

Standardabweichung des Mittelwertes $\sigma_M \pm 3 \pm 5 \pm 4 \pm 16 \pm 19 \pm 25 \pm 71 \pm 91$

*) Die Mittelwerte nach der Pankreatektomie sind signifikant größer als die Mittelwerte vor der Pankreatektomie.

Einfluß von Hypophysektomie und Pankreasrektomie auf
Rattenfettgewebe gemessene Serum(1:2)-Insulinwirkung ($\mu\text{E/ml}$)

bei den 12 Hunden der Versuchsgruppe I

Hund	Ausgangswerte	Wochen nach Hypophysektomie		Wochen nach Hypophysektomie und Pankreatektomie				
		1	2	1	2	3	4	5
L	130 100	170 80	80 130	40 20	-	-	-	-
	250 80	40 50	30 50	130	-	-	-	-
LA	180 30	-	50 50	-	-	-	-	-
	320	-	60 120	30	260 150	-	-	-
LB	-	-	70	-	120 100	-	-	-
	180	-	130 690	230	450 270	140 60	-	-
LC	-	-	270	-	1000	110	-	-
	70 80	250 350	420 270	900	340 120	130	70 110	-
	560	-	-	-	-	-	60 70	-
	-	-	-	-	-	-	40 140	-
	-	-	-	-	-	-	110 210	-
LE	1350 940	-	-	800 520	-	-	-	-
	-	-	1180 300	300	-	-	-	-
LG	1100 250	120	660 150	100	60 80	70 220	-	-
	200	-	120	-	-	130 50	-	-
	-	-	-	-	-	130 210	-	-
	-	-	-	-	-	130 230	-	-
	-	-	-	-	-	110	-	-
LH	1500 250	350	800 180	50	350 450	200 330	300 90	70 150
	-	-	-	-	150 140	-	-	30 80
	-	-	-	-	-	-	-	60 70
	-	-	-	-	-	-	-	150 130
	-	-	-	-	-	-	-	100
LI	-	-	110 140	100 290	-	-	-	-
	-	-	290 390	-	-	-	-	-
IK	430 490	240	40 380	30 80	40 100	-	-	-
	760	-	40	40	210 170	-	-	-
	-	-	-	-	30 90	-	-	-
	-	-	-	-	50	-	-	-

Tabelle 5 (Fortsetzung)

Hund	Ausgangswerte	Wochen nach Hypophysektomie					Wochen nach Hypophysektomie und Pankreatektomie				
		1	2	1	2	3	4	5			
IL	900 160 210 140 640 -	150 430 - - - -	100 230 270 - - -	20 20 20 350 30 320	- - - - - -	- - - - - -	- - - - - -	- - - - - -	-	-	-
IN	- - 620 870 110 -	- - 70 - - -	- - 170 90 90 -	60 90 40 140 50 -	- - 120 210 430 -	- - 140 - - -	- - 30 150 80 -	- - 200 1 30 3 40 40	-	-	-
IO	- - 160 180 - -	- - - - - -	- - - - - -	180 150 60 130 - -	120 70 180 - - -	240 - - - - -	- - - - - -	- - 280 2 240 1 - -	-	-	-
N=Zahl der Untersuchungen	31	12	34	33	28	17	13	19			
Zahl der Hunde	11	7	11	12	8	6	3	2			

Mittelwert M 420 188 240 166*) 209*) 155*) 112*) 143
 Standardabweichung des Mittelwertes $\sigma_{\bar{M}} \pm 69$ ± 36 ± 42 ± 37 ± 38 ± 18 ± 21 ± 25

*) Die Mittelwerte nach Pancreatektomie sind signifikant kleiner als die Ausgangswerte.

Tabelle 6 Einfluß des Serums (1:4 verdünnt) von Houssey-Hunden auf die mit dem Patten-
diaphragma gemessene Netto-Glucoseaufnahme (mg%/10 mg Trockengewicht)

Pankreatektomie		Rinder-Insulin 1000 uE/ml	Normal- hund	LL	IK	Houssey - IG	Hunde IG	LH	IG
Wochen nach				1	2	3	4	5	5
Pankreatektomie									
	3,0	7,2	5,5	4,5	-7,3	7,8	3,0	0,1	-6,4
	4,4	4,0	8,3	4,5	-0,1	0,7	-7,1	-2,8	-5,3
	3,6	8,8	3,4	7,3	-3,0	5,8	-5,1	1,2	-10,9
	6,6	14,3	15,8	11,4	-2,7	6,7	-0,4		3,6
	3,0	9,6	12,1	8,8	1,1	11,0	3,1		10,1
	-1,0	10,9	16,5	6,3	-7,0	0,7	3,1		7,9
	2,2	7,0	-1,3	2,4	-2,5	-1,0	1,6		4,1
	2,4	9,6	1,0	-3,4	9,5	-3,7	1,5		2,7
	6,4	7,0	0,9	0,8	7,3	1,7	-10,9		3,1
	4,3	7,8	7,0	1,4	5,3	5,5	0,0		3,6
	2,9	5,9	-0,2	3,1	2,1	3,5	2,4		3,3
	-0,7	2,6	4,7	5,5	-1,3	2,1	2,1		3,3
	-0,6	-0,9	4,0		3,2	3,3	3,0		3,0
	1,5	5,7	7,6		3,3	3,3	-1,4		15,3
	2,9	5,4	8,2		2,1	2,1	-0,2		-1,7
	3,7	4,6	4,9		2,1	2,1	-0,8		1,7
	3,1	9,8	1,0		2,9	2,9	-1,6		6,9
	10,2		-2,6		2,2	2,2	-3,2		11,1
	8,6		6,4		3,4	3,4	0,9		4,4
	8,7		3,7		-0,3	-0,3	-2,3		6,3
	7,0		4,6		5,8	5,8	4,3		2,2
Anzahl der									
Untersuchungen n	38		42	12	30	24	18	29	24
Mittelwert M	5,31*		4,40*	4,38*	1,82*	0,21	-0,96	1,17	2,44*
Standardabweichung des Mittelwertes σ_M	+0,58		+0,66	+1,14	+0,81	+0,79	+1,43	+0,92	+1,02

*) Die mit *) gekennzeichneten Mittelwerte sind signifikant größer als die Basalaufnahme eines Diaphragma.

Tabelle 7

Serum(1:2)-Insulinwirkung vor und nach Hypophysektomie
und Pankreatektomie bei den Hunden LC und LL

(Trennung des Antikörper-gebundenen vom freien Insulin
mit Hilfe der Elektrophorese auf Agargel)

Hund	Ausgangs- werte	nach Hypophys- ektomie	nach Hypophysektomie und Pankreatektomie
LC	15	10 15	13 21 33 11 16 8 52
LL	13 39 12 20	12 15 12 21	8 9 38 33
Mittelwert M	20	14	22
Standard- abweichung des Mittelwertes σ_M	$\pm 4,5$	$\pm 1,4$	$\pm 4,5$

Tabelle 8

Serum(1:5)-Insulinwirkung vor und nach Hypophysektomie und
Pankreatektomie bei mehreren Hunden der Versuchsgruppe L

(Trennung des Antikörper-gebundenen vom freien Insulin mit
 Hilfe eines Harziene austauschers)

Hund	Ausgangs- werte	nach Hypophysektomie	nach Hypophysektomie und Pankreatektomie
L	5,0 3,5 2,5		
LA	3,0		
LB		5,5	4,0 1,0 2,0
LC	10,0	6,0 2,0	6,0 7,5 3,5
LE	3,5		
LG	5,5 2,5	2,0	3,0 3,0
LH	5,0 4,5	3,0 0,0	6,5 0,0 0,0 3,5 9,5
LI		11,0 5,5	5,5
LK	5,0 4,5 3,0 6,5		14,0 2,0 4,5
LL	3,5 2,0	3,0 6,0	10,0 5,0
LN	2,5 0,0 5,5	3,5 7,0	1,5 4,5 17,0 1,0
LO	6,0 4,5		8,0 5,0
Mittelwert M	4,2	4,5	5,1
Standard- abweichung des Mittelwertes σ_M	$\pm 0,45$	$\pm 0,84$	$\pm 0,83$

Tabelle 9

Gegenüberstellung der mit dem Rattenfettgewebe gemessenen Serum(1:2)-Insulinwirkung und der mit der immunologischen Methode ermittelten Serum(1:10)-Insulinwirkung bei zwei Hunden vor und nach Belastung mit Wachstumshormon (2mg/kg)

Hund	Zeit nach STH-Belastung	Serum(1:2)- Insulinwirkung (Rattenfettgewebe- methode; $\mu\text{E/ml}$)	Serum(1:10)- Insulinwirkung (Immunologische Methode; $\mu\text{E/ml}$)
310	normal	220	2
	120 min	2800	250
	150 min	3600	150

314	normal	400	4
	30 min	4000	150
	60 min	2600	100

(Die Blutproben zur Bestimmung der Serum-Insulinwirkung wurden aus der vena pancreaticoduodenalis der Hunde entnommen.)

Tabelle 10

Einfluß von zonenelektrophoretisch getrennten Serumeiweiß-
fraktionen normaler Hunde (LK, LL und LN) auf die mit dem
Rattenfettgewebe gemessene Insulinwirkung ($\mu\text{E/ml}$)

	gamma- Glob.	beta- Glob.	alpha ₂ - Glob.	alpha ₁ - Glob. u. Alb.
	60	330	400	190
	50	210	160	30
	60	120	120	20
	30	240	560	60
	30	60	160	70
	70	90	500	290
	10	80	120	30
Mittelwert M	44	161	289	99
Standard- abweichung des Mittelwertes σ_M	± 8	± 38	± 72	± 38
	zusammen		zusammen	
	206		389	
	± 42		± 104	

Prozentuale Verteilung:

Mittelwert M	7%	27%	49%	17%
Standard- abweichung des Mittelwertes σ_M	$\pm 1\%$	$\pm 6\%$	$\pm 12\%$	$\pm 6\%$
	zusammen		zusammen	
	35%		65%	
	$\pm 7\%$		$\pm 17\%$	

Tabelle 11

Einfluß von zonenelektrophoretisch getrennten Serumeiweiß-
fraktionen hypophysektomierter Hunde (LL und LN) auf die
mit dem Rattenfettgewebe gemessene Insulinwirkung (μ E/ml)

	gamma- Glob.	beta- Glob.	alpha ₂ - Glob.	alpha ₁ - Glob. u. Alb.
	120	170	250	180
	40	150	300	220
	100	140	110	80
	40	80	140	190
Mittelwert M	75	135	200	168
Standard- abweichung des Mittelwertes σ_M	± 21	± 19	± 45	± 30
	zusammen		zusammen	
	210		368	
	± 36		± 71	

Prozentuale Verteilung:

Mittelwert M	13%	23%	35%	29%
Standard- abweichung des Mittelwertes σ_M	$\pm 4\%$	$\pm 3\%$	$\pm 8\%$	$\pm 5\%$
	zusammen		zusammen	
	36%		64%	
	$\pm 6\%$		$\pm 12\%$	

Tabelle 12

Einfluß von zonenelektrophoretisch getrennten Serumeiweiß-
fraktionen hypophysektomierter und pankreatektomierter
Hunde (LC, LG, LH, LK, LL und LN) auf die mit dem Ratten-
fettgewebe gemessene Insulinwirkung (μ E/ml)

gamma- Glob.	beta- Glob.	alpha ₂ - Glob.	alpha ₁ - Glob. u. Alb.
30	30	20	30
170	240	380	70
90	520	220	480
230	270	160	60
60	140	60	10
20	30	50	20
50	320	270	80
70	90	70	50
90	230	200	120
80	280	230	40
110	80	50	40
50	150	70	40
120	200	50	10
10	40	50	10
20	30	20	10
90	280	120	90
80	220	170	50
20	340	160	20
80	30	20	20
150	200	230	40
230	180	260	40
70	40	90	90
20	100	150	90
10	110	30	0
80	60	70	150
10	40	90	20
30	50	20	30
100	820	130	200
70	130	80	60
30	190	100	60
90	10	30	10
70	50	60	30
50	170	30	50
80	160	90	60

Mittelwert M	75	171	113	64
Standardabweichung $\pm 1\sigma$		± 20	± 11	± 11
des Mittelwertes σ_M		zusammen		zusammen
		246		177
		± 32		± 24

Prozentuale Verteilung:

Mittelwert M	18%	40%	27%	15%
Standardabweichung $\pm 2\sigma$		$\pm 5\%$	$\pm 3\%$	$\pm 3\%$
des Mittelwertes σ_M		zusammen		zusammen
		58%		42%
		$\pm 8\%$		$\pm 6\%$

Tabelle 13

Einfluß von zonenelektrophoretisch getrennten Serumeiweiß-
fraktionen normaler Hunde (LK, LL und LN) auf die mit dem
Rattendiaphragma gemessene Netto-Glucoseaufnahme
(mg%/10mg Trockengewicht)

	gamma- Glob.	beta- Glob.	alpha ₂ - Glob.	alpha ₁ - Glob. u. Alb.
	3,8	-0,4	2,4	5,6
	1,7	1,9	2,4	4,5
	4,4	1,8	1,4	4,9
	3,6	0,4	3,8	4,4
	0,6	5,4	0,8	4,6
	0,0	2,5	3,2	7,1
	4,0	8,8	20,7	11,7
	-10,2	3,1	17,0	2,5
	-7,5	-1,5	17,8	10,0
	-20,8		19,4	9,4

Mittelwert M	- 2,0	2,4	8,9	6,5
Standard- abweichung des Mittelwertes σ_M	$\pm 2,7$	$\pm 0,9$	$\pm 2,7$	$\pm 0,9$
	zusammen		zusammen	
	0,2		15,4	
	$\pm 3,2$		$\pm 3,4$	

Prozentuale Verteilung:

Mittelwert M	-13%	15%	57%	41%
Standard- abweichung des Mittelwertes σ_M	$\pm 17\%$	$\pm 6\%$	$\pm 17\%$	$\pm 6\%$
	zusammen		zusammen	
	1%		99%	
	$\pm 20\%$		$\pm 22\%$	

Tabelle 14

Einfluß von zonenelektrophoretisch getrennten Serumweiß-
fraktionen hypophysektomierter Hunde (LL und LN, gemischt)
auf die mit dem Rattendiaphragma gemessene
Netto-Glucoseaufnahme (mg%/10 mg Trockengewicht)

	gamma- Glob.	beta- Glob.	alpha ₂ - Glob.	alpha ₁ - Glob. u. Alb.
	4,3	5,0	-4,2	-0,1
	5,9	5,6	-0,1	0,7
	7,2	1,2	-4,8	2,1
	2,9	4,7	0,4	-0,6
	4,3	3,3	-0,5	1,0
	5,0	7,8	-0,9	-0,6
Mittelwert M	4,9	4,7	-1,7	0,4
Standard- abweichung des Mittelwertes σ_M	$\pm 0,6$	$\pm 0,8$	$\pm 0,9$	$\pm 0,4$
	zusammen		zusammen	
	9,6		-1,3	
	$\pm 0,8$		$\pm 0,8$	

Prozentuale Verteilung:

Mittelwert M	59%	57%	-21%	5%
Standard- abweichung des Mittelwertes σ_M	$\pm 7\%$	$\pm 10\%$	$\pm 11\%$	$\pm 5\%$
	zusammen		zusammen	
	116%		-16%	
	$\pm 10\%$		$\pm 10\%$	

Tabelle 15

Einfluß von zonenelektrophoretisch getrennten Serumeiweißfraktionen
hypophysektomierter und pankreatektomierter Hunde (LC, LG, LH, LK, LL, LN
auf die mit dem Rattendiaphragma gemessene Netto-Glucoseaufnahme
(mg%/10 mg Trockengewicht)

gamma-Glob.		beta-Glob.		alpha ₂ -Glob.		alpha ₁ -Glob. u. Alb.	
1,0	11,9	14,8	15,4	7,8	12,3	-	1,7 13,7
2,1	8,0	13,2	15,2	12,2	9,3	-	8,4 12,2
1,4	5,9	12,9	15,4	12,8	7,1	-	0,6 13,8
1,6	3,6	16,0	15,0	10,5	14,0	-	7,5 13,1
- 1,0	2,3	16,0	1,4	11,1	9,5	-	8,5 16,5
5,6	10,4	10,7	6,2	10,7	12,2	-	1,7 25,5
1,5	6,3	5,8	3,8	10,9	7,6	-	3,1 9,8
0,5	7,4	7,7	7,0	7,4	11,1	-	1,1 12,2
3,0	5,4	6,0	4,3	10,2	24,6	-	1,0 4,2
1,7	1,0	5,8	9,4	4,8	23,8	-	1,1 15,7
8,2	3,6	11,1	22,9	1,5	14,2	-	3,6 4,2
3,1	- 0,6	8,5	6,2	8,3	15,8	-	5,2 5,4
- 6,3	0,1	1,0	17,9	13,6	13,9	-	1,6 4,5
11,8	-29,1	- 1,8	6,3	- 2,6	1,0	-	4,3 8,7
17,1	- 9,3	- 4,4	5,3	4,1	1,6	-	13,3 8,6
- 7,2	-10,7	- 4,7	12,9	16,7	7,2	-	2,7 10,5
16,3	- 2,4	11,6	25,0	12,8	8,3	-	0,0 12,6
9,9	0,0	21,6	22,3	16,9	12,1	-	8,3 12,0
19,5	2,3	8,7	17,9	19,4	19,3	-	15,5 12,1
9,1	3,9	12,4	21,2	21,5	14,7	-	12,8 10,2
14,3	2,5	17,4	7,5	18,0	15,3	-	15,0
18,5	7,6	11,9	6,4	22,3	14,0	-	11,7
5,4	8,9	22,1	7,3	19,2	20,3	-	9,6

Mittelwert M	3,8	10,7	12,2	8,2
Standardabweichung des Mittelwertes σ_M	$\pm 1,2$	$\pm 1,1$	$\pm 0,5$	$\pm 0,9$
	zusammen		zusammen	
	14,2		19,6	
	$\pm 1,6$		$\pm 1,6$	

Prozentuale Verteilung:

Mittelwert M	11%	31%	35%	23%
Standardabweichung des Mittelwertes σ_M	$\pm 3\%$	$\pm 3\%$	$\pm 1\%$	$\pm 3\%$
	zusammen		zusammen	
	42%		58%	
	$\pm 5\%$		$\pm 5\%$	

XI. Literatur

- Antoniades, H.N.: Studies on the state of insulin in blood: State and transport of insulin in blood
Endocrinology 68, 7, 1961
Electrophoretic mobilities on paper of "free" insulin and insulin complexes of human serum
Fed. Proc. 21, No. 2, 1962
- Antoniades, H.N., Beigelman, P.M., Pennell, R.B., Thorn, G.W. und Oncley, J.R.: IIA of human plasma constituents.
III. Elution of IIA from cationic exchange resins
Metabolism 7, 266, 1958
- Antoniades, H.N., Beigelman, P.M., Tranquada, R.B. und Gunderson, K.: Studies on the state of insulin in blood: "Free" insulin and insulin complexes in human sera and their in vitro biological properties
Endocrinology 69, 46, 1961a
- Antoniades, H.N. und Gunderson, K.: Studies on the state of insulin in blood: Dissociation of purified human blood insulin complex(es) by incubation with adipose tissue extracts in vitro
Endocrinology 68, 36, 1961b
Studies on the state of insulin in blood: Material and methods for estimation of "free" and "bound" IIA in serum
Endocrinology 70, 95, 1962a
- Antoniades, H.N., Gunderson, K., Beigelman, P.M., Pyle, H.M. und Bougas, J.A.: Studies on the state, transport and regulation of insulin in human blood
Diabetes 11, 261, 1962b
- Arquilla, E.R. und Stavitsky, A.B.: The production and identification of antibodies to insulin and their use in assaying insulin
J. Clin. Invest. 35, 458, 1956
- Ball, E.G. und Knobil, E.: Insulinlike activity of serum from normal and hypophysectomized monkeys
Endocrinology 72, 658, 1963
- Banting, F.G. und Best, C.H.: The internal secretion of the pancreas
J. Lab. Clin. Med. 7, 251, 1922
Pancreatic extracts
J. Lab. Clin. Med. 7, 464, 1922
- Barron, C.N.: Ectopic pancreas in the dog, a report of three cases
Acta anat. 36, 344, 1959
- Berson, S.A.: In: Immunoassay of hormones
Ciba Found. Coll. Endocrinol. 14, 180, 1962

- Bornstein, J.: Insulin-reversible inhibition of glucose utilization by serum lipoprotein fractions
J.Biol.Chem. 205, 513, 1953
- Bornstein, J. und Park, C.R.: Inhibitor of glucose uptake by the serum of diabetic rats
J.Biol.Chem. 205, 503, 1953
- Campbell, J.: Diabetogenic action of growth hormone
In: The hypophyseal growth hormone, nature and actions; Ed. R.W. Smith, jr., O.H. Gaebler and C.N.H. Long, New York, The Blakiston Div., McGraw-Hill Book Co. Inc., 1955 p. 270
- Campbell, J., Davidson, E.W.F. und Lei, H.P.: The production of permanent diabetes by highly purified growth hormone
Endocrinology 46, 588, 1950
- Conn, J.W.: Endocrine regulation of the blood sugar
Ann.Int.Med. 38, 179, 1953
- Cuendet, R.E.: Activite insulinique des fractions proteiniqes du serum humain normal
Inaug.Diss., Frankfurt/Main 1962
- Ditschuneit, H.: Die biologische und klinische Bedeutung der Insulinwirkung von Blut und Bluteiweissfraktionen. Vergleichende Untersuchungen an Stoffwechselgesunden, Diabetikern und Prädiabetikern
Habil.Schrift, Frankfurt/Main, 1964
- Ditschuneit, H., Paulhaber, J.D. und Pfeiffer, E.F.: Verbesserung der Methode zur Bestimmung von Insulin im Blut mit Hilfe radioaktiver $1-^{14}\text{C}$ -Glucose und dem epididymalen Fettgewebe
Atompraxis 8, 172, 1962
- Ditschuneit, H., Müller-Ruchholtz, W. und Pfeiffer, E.F.: Further Studies on the insulin stimulating action of sulfonureas
Diabetes 1963, im Druck
- Ditschuneit, H., Pfeiffer, E.F., Cuendet, R., Kolb, H., Wahl, C. und Rott, W.H.: Über die Seruminsulinwirkung bei Stoffwechselgesunden und Diabetikern
1.Symp.Dtsch.Diab.Comm., Düsseldorf, 26.-27.10.1962; in: Oberdisse, K. und Jahnke, K.: Fortschritte der Diabetesforschung, Thieme, Stuttgart, 1963, S.37
- Ditschuneit, H., Pfeiffer, E.F. und Rossenbeck, H.E.: Über die Bestimmung von Insulin im Blute am epididymalen Fettanhang der Ratte mit Hilfe markierter Glukose. III. Die Wirkung von Sulfonharnstoffen und Biguanid (DBI) auf den Kohlenhydratstoffwechsel des isolierten Rattenfettgewebes und Ratten-Zwerchfells
Klin.Wschr. 39, 71, 1961

- Egdahl, R.H. und
Goldberg, H.: Pancreatic and hepatic influences on serum insulin-like activity in the dog Surg.Gyn.Obstetr. 114, 262, 1962
- Essex, H.E. und
Astarabadi, T.M.: Transbuccal hypophysectomy in the dog Ann.Surg. 138, 143, 1953
- Fisher, R.A.: Statistical methods for research workers VII. Aufl., London, 1938
- Froesch, E.R.: Insulin im Blut: durch Insulin-Antikörper hemmbare und nicht hemmbare Insulinaktivität und ihre physiologische Bedeutung 1.Symp.Dtsch.Diab.Comm., Düsseldorf, 26.-27.10.1962; in: Oberdisse, K. und Jahnke, K.: Fortschritte der Diabetesforschung, Thieme, Stuttgart, 1963, S.30
- Gey, G.O. und Gey, M.K.: The maintenance of human normal cells and tumor cells in continuous culture. I. Preliminary report: cultivation of mesoblastic tumors and normal tissue and notes on methods of cultivation Amer.J.Cancer 27, 45, 1936
- Goldberg, H.L. und
Egdahl, R.H.: Studies suggesting the extra-pancreatic production of substances with insulin-like activity Fed.Proc. 20, 190, 1961 (Abstr.)
- Grassmann, W., Hannig, K.,
und Knedel, M.: Über ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf Filterpapier Dtsch.Med.Wschr. 76, 333, 1951
- Grodsky, G.M. und
Forsham, P.H.: An immunochemical assay of total extractable insulin in man J.Clin.Invest. 39, 1070, 1960
- Groen, J., Kamminga, C.E.,
Willebrands, A.F. und
Blickman, J.R.: Evidence for the presence of insulin in blood serum. A method for an approximate determination of the insulin content of blood. J.Clin.Invest. 31, 97, 1952
- Houssay, B.A. und
Biasotti, A.: Le diabète pancréatique des chiens hypophysectomisés Q.R.Soc.Biol.Paris 105, 121, 1930a
Les troubles diabétiques chez les chiens privés d'hypophyse et de pancréas C.R.Soc.Biol.Paris 105, 124, 1930b
Hypophysektomie und Pankreasdiabetes bei der Kröte Pflügers Arch.Physiol. 227, 239, 1931a
Pankreasdiabetes und Hypophyse beim Hund Pflügers Arch.Physiol. 227, 664, 1931b

- Houssay, B.A., Biasotti, A. und Rietti, C.T.: Action diabétogène de l'extrait anté-hypophysaire
C.R.Soc.Biol.Paris 111, 479, 1932
- Huggett, A.St.G. und Nixon, D.A.: Use of glucose oxidase, peroxidase and o-dianisidine in determination of blood and urinary glucose
Lancet 2, 368, 1957a
Biochem.J. 66, 12, 1957b
- Ingle, D.J.: Production of glycosuria in normal rat by means of 17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone
Endocrinology 29, 649, 1941
- Ingle, D.J., Li, C.H. und Evans, H.M.: Effect of adrenocorticotrophic hormone on urinary excretion of sodium, chloride, potassium, nitrogen and glucose in normal rats
Endocrinology 39, 32, 1946
- King, E.J.: Colorimetric method for "true sugar" in 0.1 (0.05) ml of blood
in: Medical Biochemistry, 2nd ed. London, J.A.Churchill, 1951, p-23
- Koller, S.: Handbuch der Erbbiologie des Menschen
Berlin, Springer, 1940
Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen
II. Aufl., Dresden und Leipzig, Steinkopff, 1943
- Krebs, H.A. und Henseleit, K.: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper
Z.Physiol.Chem. 210, 33, 1932
- Kunkel, H.G. und Slater, R.J.: Zone electrophoresis in a starch supporting medium
Proc.Soc.Exp.Biol. 80, 42, 1952
- Leonards, J.R.: Insulin-like activity of blood, what it is?
Fed.Proc. 18, 272, 1959
- Leonards, J.R., Landau, B.R. und Bartsch, G.: Assay of insulin and insulin-like activity with rat epididymal fat pad
J.Lab.Clin.Med. 60, 552, 1962
- Long, C.N.H. und Lukens, F.D.W.: The effects of adrenalectomy and hypophysectomy upon experimental diabetes in the cat
J.Exper.Med. 63, 465, 1936
- Lowy, C., Blanshard, G. und Phear, D.: Antagonism of insulin by albumin
Lancet 1, 802, 1961

- Lyngsoe, J.: The insulin-like activity in serum determined by the rat epididymal fat method. III. Insulin antagonism in serum from normal persons and diabetics, including some observations in pig's blood Acta Med.Scandinav. 172, 601, 1962
- Markowitz, J. und Archibald, J.: Transbuccal hypophysectomy in the dog Can.J.Biochem.Physiol. 34, 422, 1956
- Martin, D.B., Dagenais, Y.M., Pfeiffer, E.F. und Renold, A.E.: Insulinbioassay using adipose tissue III. Kongr.Internat.Diab.Fed., Düsseldorf, 21-25.7.1958; in: Oberdisse, K. und Jahnke, K.: Diabetes mellitus, Thieme, Stuttgart, 1959, S.592
- Martin, D.B., Renold, A.E. und Dagenais, Y.M.: An assay for insulin-like activity using rat adipose tissue Lancet 2, 76, 1958
- Meade, R.C. und H.M.Klitgaard: Simplified method for immuno-assay of human serum insulin J.Nucl.Med. 3, 407, 1962
- Melani, F., Ditschuneit, H., Ditschuneit, H.H., Mucci, A. und Pfeiffer, E.F.: Immunologische Bestimmung von Insulin im Blut mit Hilfe von Insulinantikörpern und Jod-131-markiertem Insulin Tag.Dtsch.Ges.Endokrinol., Wien, 7.-9.3.1963; Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, im Druck (a)
- Melani, F., Ditschuneit, H., Ditschuneit, H.H., Petzoldt, R. und Pfeiffer, E.F.: Vergleichende Seruminsulinbestimmungen mittels einer biologischen und einer immunologischen Methode II. Internat.Symp.über Diabetesfragen, 2.-6.10.1963, Karlsruhe/Greifswald (b)
- Mering, J.von und Minkowski, O.: Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation Arch.Exper.Path.Pharmakol. 26, 371, 1889-90
- Milstein, S.W.: Oxidation of specifically labeled glucose by rat adipose tissue Prec.Soc.Exp.Biol.Med. 92, 632, 1956
- Müller-Ruchholtz, W., Ditschuneit, H., Dettwyler, W., Böhm, W., Friedrich, H., Ohebschalon, E., Petzoldt, R., Sartory, A. und Pfeiffer E.F.: Direct measurements of insulin secretion in dogs following various types of insulin stimulation Acta Endocrinol.Congr., Genf, 1962, Abstr. Nr.118
- Okumura, K.: Measurement of serum insulin activity and the investigation about the nature of diabetes mellitus Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi 35, 1564, 1960

- Pfeiffer, E.F.: Wachstum und Diabetes mellitus
Dtsch. Med. Wschr. 82, 1789, 1957
- Pfeiffer, E.F., Ditschuneit, H. und Schöffling, K.: Die orale Diabetesbehandlung mit Sulfonylharnstoffen unter dem Aspekt des endokrinen Defekts beim Altersdiabetiker
Chemotherapie 2, 283, 1961
- Pfeiffer, E.F., Ditschuneit, H. und Ziegler, R.: Über die Bestimmung von Insulin im Blute am epididymalen Fettanhang der Ratte mit Hilfe markierter Glukose. IV. Die Dynamik der Insulinsekretion des Stoffwechselgesunden und des Altersdiabetikers nach wiederholter Belastung mit Glukose, Sulfonylharnstoffen und menschlichem Wachstumshormon, ein Beitrag zur Pathogenese des menschlichen Altersdiabetes
Klin. Wschr. 39, 415, 1961
- Pfeiffer, E.F., Pfeiffer, M., Ditschuneit, H. und Chang-Su Ahn: Über die Bestimmung von Insulin im Blute am epididymalen Fettanhang der Ratte mit Hilfe markierter Glukose. II. Experimentelle und klinische Erfahrungen
Klin. Wschr. 37, 1239, 1959
- Pfeiffer, E.F., Renold, A.E., Martin, D.B., Dagenais, Y.M., Meakin, J.W., Nelson, D.H., Shoemaker, G. und Thorn, G.W.: Untersuchungen über die Rolle des Pankreas im Wirkungsmechanismus blutzuckersenkender Sulfonylharnstoffe
III. Kongr. Internat. Diab. Fed., Düsseldorf, 21.-25.7.1958; in: Oberdisse, K. und Jahnke, K.: Diabetes mellitus, Thieme, Stuttgart, 1959, S. 298
- Pfeiffer, E.F., Steigerwald, H., Sandritter, W., Bänder, A., Mager, A., Becker, U. und Retiene, K.: Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus blutzuckersenkender Sulfonylharnstoffe.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 63, 604, 1957
- Ramseier, E.B., Froesch, E.R., Bally, P. und Labhart, A.: Serum-Insulinbestimmung am Fettgewebe in vitro: Beeinflussung durch andere Hormone, "freie" und "gebundene" Insulinaktivität
4e Congr. Fed. Internat. Diab., Genf, Med. Hyg., 1961, S. 643
- Randle, P.J.: Assay of plasma-insulin activity by the rat diaphragm method
Brit. Med. J. 1, 1237, 1954
- Randle, P.J. und Young, F.G.: The influence of pituitary growth hormone on plasma insulin activity
J. Endocrinol. 13, 335, 1956
- Renold, A.E., Martin, D.B., Dagenais, Y.M., Steinke, J., Nickerson, R.J. und Sheps, M.C.: Measurement of small quantities of insulin-like activity using rat adipose tissue. I. A proposed procedure
J. Clin. Invest. 39, 1487, 1960

- Renold, A.E. und Steinke, J.: Studies with measurements of insulin-like activity (ILA) in serum
1. Symp. Dtsch. Diab. Comm., Düsseldorf, 26.-27.10.1962; in: Oberdisse, K. und Jahnke, K.: Fortschritte der Diabetesforschung, Thieme, Stuttgart, 1963, S.1
- Ringer, S.: Further experiments regarding the influence of small quantities of lime, potassium, and other salts on muscular tissue
J. Physiol. 7, 291, 1886
- Robinson, B.H.B. und Wright, P.H.: Guinea-pig anti-insulin serum
J. Physiol. 155, 302, 1961
- Samaan, N., Fraser, R. und Dempster, W.J.: The "typical" and "atypical" forms of serum insulin
Diabetes 12, 339, 1963
- Saure, E.: Insulinaktivitäten im Plasma von Hunden nach Pankreatektomie
Inaug. Diss., Frankfurt/Main 1963
- Scott, D.A. und Fisher, A.M.: The insulin and the zinc content of normal and diabetic pancreas
J. Clin. Invest. 17, 725, 1938
- Sheps, M.C., Nickerson, R.J., Dagenais, Y.M., Steinke, J., Martin, D.B. und Renold, A.E.: Measurement of small quantities of insulin-like activity using rat adipose tissue
II. Evaluation of performance
J. Clin. Invest. 39, 1499, 1960
- Sirek, A.: A hook-like instrument for atraumatic ligation of minute vessels
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94, 526, 1957
Persönliche Mitteilung, 1963
- Sirek, A., Sirek, O.V. und Hanus, Y.: Effect of carbutamide in a "depancreatized" dog with a small ectopic pancreas
Metabolism 9, 660, 1960
- Slater, J.D.H., Samaan, N., Fraser, R. und Stillman, D.: Immunological studies with circulating insulin
Brit. Med. J. 1, 1712, 1961
- Steinke, J., Sirek, A., Lauris, V., Lukens, F.D.W. und Renold, A.E.: Measurement of small quantities of insulin-like activity with rat adipose tissue. III. Persistence of serum insulin-like activity after pancreatectomy
J. Clin. Invest. 41, 1699, 1962
- Student, A.: The probable error of the mean
Biometrika, London, 6, 1908

- Takeuchi, S., Ohashi, S. und Kobayashi, Y.: Quantitative assay of insulin in blood plasma in normal and alloxanized dogs by rat diaphragm method
J. Pharmacol. Exper. Ther. 119, 436, 1957
- Vallance-Owen, J.: Insulin antagonists
Brit. Med. Bull. 16, 214, 1960a
Assays of insulin in the plasma in: Diabetes, R.H. Williams, Ed., N.Y., P.B. Hoeber, Inc. 1960, p. 423(b)
Antagonists of insulin
1. Symp. Dtsch. Diab. Comm., Düsseldorf, 26.-27.10.1962; in Oberdisse, K. und Wahnke, K.: Fortschritte der Diabetes-Forschung, Thieme, Stuttgart, 1963, S. 10
- Vallance-Owen, J. und Hurlock, B.: Estimation of plasma-insulin by the rat diaphragm method
Lancet 1, 68, 1954
- Vallance-Owen, J., Dennes, E. und Campbell, P.N.: Insulinantagonism in plasma of diabetic patients and normal subjects
Lancet 2, 336, 1958 a
The nature of the insulin antagonists associated with plasma albumin
Lancet 2, 696, 1958 b
- Vallance-Owen, J. und Lilley, M.D.: An insulin antagonist associated with plasma-albumin
Lancet 1, 804, 1961 a
Insulin antagonism in the plasma-albumin of obese diabetics and prediabetics
Lancet 1, 806, 1961 b
- Vallance-Owen, J. und Lukens, F.D.W.: Studies on insulin antagonism in plasma
Endocrinology 60, 625, 1957
- Vallance-Owen, J. und Wright, P.H.: Assay of insulin in blood
Phys. Rev. 40, 219, 1960
- Wardlaw, A.C. und Moloney, P.J.: The assay of insulin with anti-insulin and mouse-diaphragm
Canad. J. Biochem. Physiol. 39, 695, 1961
- Weber, E.: Grundriss der biologischen Statistik für Naturwissenschaftler und Mediziner
Fischer, Jena, 1948
- Whitney, J.E. und Young, F.G.: Some hormonal influences on the glucose uptake of normal rat diaphragm in vitro
Biochem. J. 66, 648, 1957

- Willebrands, A.F., van der Geld, H. und Groen, J.: Determination of serum insulin using the isolated rat diaphragm. The effect of serum dilution
Diabetes 7, 119, 1958
- Wissenschaftliche Tabellen 6. Aufl., J.R. Geigy A.G., Basel 1960
- Wright, P.H.: The effect of insulin antibodies on glucose uptake by the isolated rat diaphragm
Biochem. J. 71, 633, 1959
- Yalow, R.S. und Berson, S.A.: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods
Nature 184, 1648, 1959
- Immunoassay of endogenous plasma-insulin in man
J. Clin. Invest. 39, 1157, 1960 a
- Plasma insulin concentrations in nondiabetic and early diabetic subjects
Diabetes 9, 254, 1960 b
- Immunoassay of plasma insulin in man
Diabetes 10, 339, 1961
- Young, F.G.: Permanent experimental diabetes produced by pituitary (anterior lobe) injections
Lancet 2, 372, 1937
- Diabetic action of crude anterior pituitary extracts
Biochem. J. 32, 513, 1938
- Zuelzer, G., Dorn, M. und Merxer, A.: Neuere Untersuchungen über den experimentellen Diabetes
Dtsch. Med. Wschr. 34, 1880, 1908

XII. Lebenslauf

Am 17.4.1938 wurde ich als erstes Kind des Bundesbahnpräsidenten Artur Petzoldt und seiner Frau Eva, geb. Bonert, in Wuppertal geboren.

Vom Herbst 1944 bis zum April 1949 besuchte ich die Volksschule in Plaue an der Havel, Wuppertal und Essen. 1949 trat ich in das Staatliche Humanistische Burggymnasium in Essen ein, wo ich 1958 das Abitur bestand.

Im selben Jahr begann ich das Medizinstudium an der Universität Marburg/Lahn, an der ich am 10.3.1959 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 31.10.1960 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Nach einem Studiensemester an der Universität Wien setzte ich im Winter 1961 mein Studium an der Universität Frankfurt/Main fort, wo ich am 13.7.1964 die ärztliche Prüfung mit dem Urteil "gut" bestand.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer:

Botanik	Prof. Pirson (Marburg)
Zoologie	Prof. Seidel (Marburg)
Physik	Prof. Walcher (Marburg)
Chemie	Prof. Dimroth (Marburg)
Anatomie	Prof. Niessing und Prof. Petry (Marburg) Prof. Starck und Prof. Frick (Frankfurt)
Physiologie	Prof. Hensel (Marburg)
Botanik	Prof. Bucher (Marburg)
Pathologie	Prof. Prinz (Marburg), Prof. Chiari (Wien), Prof. Rotter, Prof. Kahlau und Prof. Lapp (Frankfurt)
Pharmakologie	Prof. Schmid (Marburg), Prof. Holtz (Frankfurt)
Hygiene	Prof. Herzberg (Frankfurt)
Geschichte der Medizin	Prof. Artelt (Frankfurt)
Naturheilkunde	Prof. Amelung (Frankfurt)
Gerichtliche Medizin	Prof. Gerchow und Prof. Luff (Frankfurt)
Innere Medizin	Prof. Bock (Marburg), Prof. Fellingner (Wien), Prof. Hoff und Prof. Frey (Frankfurt)
Chirurgie	Prof. Schwaiger (Marburg), Prof. Kunz (Wien), Prof. Geissendörfer und Prof. Weber (Frankfurt)
Frauenheilkunde	Prof. Huber (Marburg), Prof. Antoine (Wien) Prof. Käser (Frankfurt)
Kinderheilkunde	Prof. Weisse (Frankfurt)
Haut- und Geschlechts- krankheiten	Prof. Herrmann (Frankfurt)
Augenheilkunde	Prof. Thiel (Frankfurt)
Hals-, Nasen- und Ohren- Krankheiten	Prof. Mittermaier (Frankfurt)
Nerven- und Gemütskrank- heiten	Prof. Zutt (Frankfurt)
Zahnheilkunde	Prof. v. Reckow (Frankfurt)
Orthopädie	Prof. Güntz (Frankfurt)

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Die Insulinwirkung im Serum von Houssay-Hunden

in der Endokrinologischen Abteilung der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt/Main unter Leitung von Herrn Professor Dr. K. Schöffling mit Unterstützung durch Herrn Professor Dr. E. F. Pfeiffer und Herrn Privatdozenten Dr. H. Ditschuneit ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt/Main, den 9.4.1964

Rudolf Petzold

